

1663  
89/26971  
**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**NOTIFICATION OF ELECTION**  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:  22 May 1998 (22.05.98)	
International application No.:  PCT/JP97/03997	Applicant's or agent's file reference:  F 3511 PT
International filing date:  31 October 1997 (31.10.97)	Priority date:  08 November 1996 (08.11.96)
Applicant:  SAKAI, Takeshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
  
19 February 1998 (19.02.98)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
  
\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

77  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>F 3511 PT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. <b>PCT/JP97/03997</b>	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) <b>31 October 1997 (31.10.1997)</b> Priority date ( <i>day/month/year</i> ) <b>08 November 1996 (08.11.1996)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>A61K 35/78, A61K 35/80, A61K 35/84, A61K 35/66, A61K 38/00</b>	
Applicant <b>TAKARA SHUZO CO., LTD.</b>	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 38 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>19 February 1998 (19.02.1998)</b>	Date of completion of this report <b>02 November 1998 (02.11.1998)</b>
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer Telephone No. (81-3) 3581 1101

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/03997

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- the international application as originally filed.
- the description, pages \_\_\_\_\_, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 10 July 1998 (10.07.1998),  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- the claims, Nos. 4-8,12-16, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1,3,9,11, filed with the letter of \_\_\_\_\_ 10 July 1998 (10.07.1998),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- the drawings, sheets/fig 1-26, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- the description, pages \_\_\_\_\_
- the claims, Nos. 2,10
- the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

## 4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP97/03997

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1,3-9,11-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1,3-9,11-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1,3-9,11-16	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Document 1: JP, 60-19716, A

Document 2: JP, 7-149786, A

Document 3: JP, 8-169891, A

Document 4: Surette, Marc E. et al., Biochemistry, (1996) 35 (28), p. 9187-96

Document 5: Boggs, Kevin P. et al., J. Biol. Chem., (1995), 270 (19), p.11612-18

Document 6: Jayadev, S., et al., J. Biol. Chem., (1995), 270 (5), p. 2947-52

Document 7: Robertson, Noreen M. et al., Cancer Res., (1995), 55 (3), p. 548-56

**Explanation:**

Documents 1 through 3 cited in the ISR and documents 4 through 7 newly cited in the IPER neither describe nor suggest the inventions disclosed in Claims 1, 3 through 9, 11 through 16. Therefore the subject matter of Claims 1, 3 through 9 and 11 through 16 appear to be novel and to involve an inventive step.

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/JP97/03997

**VI. Certain documents cited****1. Certain published documents (Rule 70.10)**

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO, 97/04765, A1			

[P,A]

**2. Non-written disclosures (Rule 70.9)**

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

E P

US

P C T

## 特許協力条約

09/269711

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 F 3511 PT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/03997	国際出願日 31. 10. 97 (日.月.年)	優先日 08. 11. 96 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 寶酒造株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。 この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1.  請求の範囲の一部の調査ができない(第Ⅰ欄参照)。
2.  発明の単一性が欠如している(第Ⅱ欄参照)。
3.  この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
  - この国際出願と共に提出されたもの
  - 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
    - しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
  - この国際調査機関が書換えたもの
4. 発明の名称は  出願人が提出したものを承認する。
  - 次に示すように国際調査機関が作成した。

---

5. 要約は  出願人が提出したものを承認する。
  - 第Ⅲ欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。
6. 要約書とともに公表される図は、  
第\_\_\_\_図とする。  出願人が示したとおりである.  なし
  - 出願人は図を示さなかった。
  - 本図は発明の特徴を一層よく表している。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' A 61K 35/78, 80, 84, 66, 38/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' A 61K 35/78, 80, 84, 66, 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）  
CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 60-19716, A (武田薬品工業株式会社), 31. 1月. 1985 (3 1. 01. 85), 全文 (ファミリーなし)	2
Y		10
A		1, 3-9, 11-16
X	JP, 7-149786, A (財団法人相模中央化学研究所), 13. 6月. 199 5 (13. 06. 95), 全文 (ファミリーなし)	2
Y		10
A		1, 3-9, 11-16
Y	JP, 8-169891, A (アビ株式会社), 2. 7月. 1996 (02. 07. 96), 全文 (ファミリーなし)	10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
05. 01. 98

国際調査報告の発送日

13.01.98

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）  
富永 保

4C 9159



電話番号 03-3581-1101 内線 3454

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 6-25002, A (株式会社ツムラ), 1. 2月. 1994 (01. 02. 94), 全文&WO, 93/23033, A&AU, 9342722, A&EP, 642793, A	1-16
A	J P, 6-72888, A (株式会社ツムラ), 15. 3月. 1994 (15. 03. 94), 全文 (ファミリーなし)	1-16

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03997

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K35/78, 80, 84, 66, 38/00,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K35/78, 80, 84, 66, 38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 60-19716, A (Takeda Chemical Industries,	2
Y	Ltd.),	10
A	January 31, 1985 (31. 01. 85), Full text (Family: none)	1, 3-9, 11-16
X	JP, 7-149786, A (Sagami Chemical Research	2
Y	Center),	10
A	June 13, 1995 (13. 06. 95), Full text (Family: none)	1, 3-9, 11-16
Y	JP, 8-169891, A (Abi K.K.), July 2, 1996 (02. 07. 96), Full text (Family: none)	10
A	JP, 6-25002, A (Tsumura & Co.), February 1, 1994 (01. 02. 94), Full text & WO, 93/23033, A & AU, 9342722, A & EP, 642793, A	1 - 16

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 5, 1998 (05. 01. 98)

Date of mailing of the international search report

January 13, 1998 (13. 01. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/0,3997

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP,-6-72888, A (Tsumura & Co.), March 15, 1994 (15. 03. 94), Full text (Family: none)	1 - 16

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' A 61 K 35/78, 80, 84, 66, 38/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' A 61 K 35/78, 80, 84, 66, 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C A (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 60-19716, A (武田薬品工業株式会社), 31. 1月. 1985 (3 1. 01. 85), 全文 (ファミリーなし)	2
Y		10
A		1, 3-9, 11-16
X	J P, 7-149786, A (財団法人相模中央化学研究所), 13. 6月. 199 5 (13. 06. 95), 全文 (ファミリーなし)	2
Y		10
A		1, 3-9, 11-16
Y	J P, 8-169891, A (アビ株式会社), 2. 7月. 1996 (02. 07. 96), 全文 (ファミリーなし)	10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたも  
の

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理  
論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.01.98

国際調査報告の発送日

13.01.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

富永 保

印

4 C 9159

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

## 国際調査報告

国際出願番号 P.C.T./JP97/03997

C(続き) 関連すると認められる文献	引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	A	JP, 6-25002, A (株式会社ツムラ), 1. 2月. 1994 (01. 02. 94), 全文&WO, 93/23033, A&AU, 9342722, A&EP, 642793, A	1-16
	A	JP, 6-72888, A (株式会社ツムラ), 15. 3月. 1994 (15. 03. 94), 全文 (ファミリーなし)	1-16

13. Tai, P.-K. K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N., Duhring, J., and Faber, L. A 59-kilodalton protein associated with progestin, estrogen, androgen, and glucocorticoid receptors. *Biochemistry*, **25**: 5269-5275, 1986.
14. Yen, A. W., Tornasselli, A. G., Heinrikson, R. L., Zurcher-Neeley, H., Ruff, V. A., Johnson, R. A., and Deibel, M. R. The Hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *J. Biol. Chem.*, **267**: 2868-2871, 1992.
15. Mendel, D. B., Bodwell, J. E., Gametchu, B., Harrison, R. W., and Munck, A. Molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid-receptor complexes contain a 90-kDa non-steroid binding phosphoprotein that is lost on activation. *J. Biol. Chem.*, **261**: 3758, 1986.
16. Howard, K. J., and Distelhorst, C. W. Evidence for intracellular association of the glucocorticoid receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.*, **263**: 3474-3481, 1988.
17. Dalman, F. C., Bresnick, E. H., Patel, P. D., Perdew, G. H., Watson, S. J. Jr., and Pratt, W. B. Direct evidence that the glucocorticoid receptor binds to hsp90 at or near the termination of receptor translation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **264**: 19815-19821, 1989.
18. Schmidt, T. J., and Litwack, G. Activation of the glucocorticoid-receptor complex. *Physiol. Rev.*, **62**: 1131-1191, 1982.
19. Bodine, P. V., and Litwack, G. The glucocorticoid receptor and its endogenous regulators. *Receptor*, **1**: 83-120, 1990.
20. Tai, P.-K. K., Albers, M. W., Chang, H., Faber, L., and Schreiber, S. L. Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* (Washington DC), **256**: 1315-1318, 1992.
21. Daniels, M., Northrop, J. P., Jonklaas, J., and Ringold, G. M. Domains of the glucocorticoid receptor involved in specific and nonspecific deoxyribonucleic acid binding, hormone activation, and transcriptional enhancement. *Mol. Endocrinol.*, **1**: 815-822, 1987.
22. Danielson, M., Hinck, L., and Ringold, G. M. Mutational analysis of the mouse glucocorticoid receptor. *Cancer Res. Suppl.*, **49**: 2286s-2291s, 1989.
23. Bodine, P. V., and Litwack, G. Evidence that the modulator of the glucocorticoid-receptor complex is the endogenous molybdate factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 1462-1466, 1988.
24. Bodine, P. V., and Litwack, G. Purification and structural analysis of the modulator of the glucocorticoid-receptor complex. Evidence that modulator is a novel phosphoglyceride. *J. Biol. Chem.*, **263**: 3501-3512, 1988.
25. Bodine, P. V., and Litwack, G. Modulator: the missing link. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **74**: L77-L81, 1990.
26. Schulman, G., Bodine, P. V., and Litwack, G. Modulators of the glucocorticoid receptor also regulate mineralocorticoid receptor function. *Biochemistry*, **31**: 1734-1741, 1992.
27. Hsu, T.-C., Bodine, P. V., and Litwack, G. Endogenous modulators of glucocorticoid receptor function are also potent regulators for purified protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **266**: 17573-17579, 1991.
28. Alnemri, E. S., and Litwack, G. Glucocorticoid-induced lymphocytolysis is not mediated by an induced nuclease. *J. Biol. Chem.*, **264**: 4104-4111, 1989.
29. Alnemri, E. S., and Litwack, G. Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoid and novobiocin. *J. Biol. Chem.*, **265**: 17323-17333, 1990.
30. Wyllie, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* (Lond.), **284**: 555-556, 1980.
31. Wyllie, A., Kerr, J., and Currie, A. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**: 251-306, 1980.
32. Vaux, D. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 786-789, 1993.
33. Cohen, J. J., and Duke, R. C. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.*, **132**: 38-42, 1984.
34. Compton, M. M., and Cidlowski, J. A. Rapid *in vivo* effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*, **118**: 38-45, 1986.
35. Schwartzman, R., and Cidlowski, J. A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.*, **14**: 133-151, 1993.
36. Yuh, Y. S., and Thompson, E. B. Glucocorticoid effect on oncogene/growth gene expression in human T lymphoblastic leukemia cell line CCRF-CEM. *J. Biol. Chem.*, **264**: 10904-10910, 1989.
37. Celiker, M. Y., Haas, A., Saunders, D., and Litwack, G. Specific regulation of male rat liver cytosolic estrogen receptor by the modulator of the glucocorticoid receptor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**: 151-157, 1993.
38. Robertson, N. M., Schulman, G., Karnik, S., Alnemri, E., and Litwack, G. Demonstration of nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor (MR) using an anti-MR antibody and confocal laser scanning microscopy. *Mol. Endocrinol.*, **7**: 1226-1239, 1993.
39. Urda, L. A., Yen, P. M., Simons, S. S., and Harmon, J. Region-specific antiglucocorticoid receptor antibodies selectively recognize the activated form of the ligand-occupied receptor and inhibit the binding of activated complexes to denoxynucleic acid. *Mol. Endocrinol.*, **3**: 251-269, 1989.
40. Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E., and Strober, W. Peptides. In: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, pp. 9.3.1-9.3.4. New York: Green Publishing Wiley-Interscience, 1991.
41. Lindemeyer, R. G., Robertson, N. M., and Litwack, G. Glucocorticoid receptor monoclonal antibodies define the biological action of RU 38486 in intact B16 melanoma cells. *Cancer Res.*, **50**: 7985-7991, 1990.
42. Qi, M., Stasenko, L. J., and DeFranco, D. B. Recycling and desensitization of glucocorticoid receptors in v-mos transformed cells depends on the ability of nuclear receptors to modulate gene expression. *Mol. Endocrinol.*, **4**: 455-464, 1990.
43. Qi, M., Hamilton, B. J., and DeFranco, D. v-mos oncogenes affect the nuclear retention and reutilization of glucocorticoid receptors. *Mol. Endocrinol.*, **3**: 1279-1288, 1989.
44. Alberts, B., and Herrick, G. DNA-cellulose chromatography. *Methods Enzymol.*, **21**: 193-217, 1971.
45. Schmidt, T. J., Miller-Diener, A., Webb, M. L., and Litwack, G. Thermal activation of the purified rat hepatic glucocorticoid receptor. Evidence for a two-step mechanism. *J. Biol. Chem.*, **260**: 16255-16262, 1985.
46. Hsu, T. C., Melchiorre, L. P., Maksymowich, A. B., Kmiec, E., and Litwack, G. Assembly of glucocorticoid receptor and c-jun homodimer on the promoter of mouse mammary tumor virus long terminal repeat is influenced by order of addition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**: 1260-1266, 1993.
47. Jacobson, M., Burne, J. F., King, M. P., Miyashita, T. C. R. J., and Raff, M. C. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* (Lond.), **361**: 365-369, 1993.
48. Chomczynski, P., and Sacchi, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159, 1987.
49. Mendel, D. B., Bodwell, J. E., and Munck, A. Glucocorticoid receptors lacking hormone-binding activity are bound in nuclei of ATP-depleted cells. *J. Biol. Chem.*, **234**: 478-480, 1986.
50. Sanchez, E. R. Heat shock induces translocation to the nucleus of the unliganded glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*, **267**: 17-20, 1992.
51. Thompson, E. B., Srivastava, D., and Johnson, B. H. Interactions of the phenylpyrazole steroid cortivazol with glucocorticoid receptors in steroid-sensitive and -resistant human leukemic cells. *Cancer Res. Suppl.*, **49**: 2253s-2258s, 1989.
52. Dieken, E. S., and Meisfeld, R. L. Transcriptional transactivation functions localized to the glucocorticoid receptor N-terminus are necessary for steroid induction of lymphocyte apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 589-597, 1992.
53. Barsony, J., and McKoy, W. Molybdate increases intracellular 3', 5'-guanosine cyclic monophosphate and stabilizes vitamin D receptor association with tubulin-containing fragments. *J. Biol. Chem.*, **267**: 24457-24463, 1992.
54. Kerr, J., Wyllie, A., and Currie, A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**: 239-257, 1972.
55. Reik, A., Schultz, G., and Stewart, A. F. Glucocorticoids are required for establishment and maintenance of an alteration in chromatin structure: induction leads to a reversible disruption of nucleosomes over an enhancer. *EMBO J.*, **10**: 2569-2576, 1991.
56. Adams, C. C., and Workman, J. L. Nucleosome displacement in transcription. *Cell*, **72**: 305-308, 1993.
57. Reeves, R. Chromatin changes during the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**: 413-423, 1992.
58. Archer, T. K., Cordingley, M. G., Wolford, R. G., and Hager, G. L. Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 688-698, 1991.
59. Kornberg, R. D., and Lorch, Y. Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **8**: 563-587, 1992.
60. Thulasi, R., Harbour, D., and Thompson, E. B. Suppression of c-myc. *J. Biol. Chem.*, **268**: 18306-18312, 1993.
61. Amati, B., Brooks, M. W., Levy, N., Littlewood, T. D., Evan, G., and Land, H. Oncogenic activity of the c-myc protein requires dimerization with max. *Cell*, **72**: 233-243, 1993.
62. Harrington, E. A., Fanidi, A., and Evan, G. I. Oncogenes and cell death. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**: 120-129, 1994.
63. Pardee, A. B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* (Washington DC), **246**: 603-608, 1989.
64. Alnemri, E. S., Fernandes, T. F., Haldar, S., Croce, C., and Litwack, G. Involvement of BCL-2 in glucocorticoid-induced apoptosis of human pre-B leukemias. *Cancer Res.*, **52**: 491-495, 1992.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

partial inhibition of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase activity in crude cell extracts (58). BM41.440 arrests CA46 cells in the G<sub>2</sub> phase of the cell cycle (59), thus mimicking our findings with ET-18-OCH<sub>3</sub> (Fig. 2). It will be important to determine whether LPC also overrides the cytotoxic effects of these drugs.

Our results also suggest that membrane phospholipid content may be monitored by the mammalian cell cycle apparatus. The arrest of BAC1.2F5 cells in the G<sub>2</sub> phase when phospholipid accumulation is blocked during the S phase is reminiscent of the response of cells to S phase DNA damage. Cells irradiated in the S phase delay in G<sub>2</sub> to allow DNA repair before the cells commit to mitosis (60). By analogy, the G<sub>2</sub> arrest of cells with insufficient phospholipid would provide a mechanism to ensure complete membrane formation prior to cell division. Hartwell and Weinert (61) coined the term "checkpoint" to define the process in G<sub>2</sub> that monitors completion of DNA replication and DNA damage before allowing progression into the M phase. Research on the biochemical mechanism for G<sub>2</sub> arrest in response to DNA damage has focused on the regulation of the cyclin B/cdc2 kinase complex, because the formation and activation of this complex are necessary for entry into the M phase (61–68). Cells delayed in G<sub>2</sub> accumulate the hyperphosphorylated, inactive form of the cdc2 kinase subunit. ET-18-OCH<sub>3</sub> and other cytotoxic ether lipids may not arrest cells by exactly the same mechanism, because they do not directly damage DNA (11, 13). A unique biochemical mechanism for G<sub>2</sub> arrest by antineoplastic lipids is suggested by the finding that, in cells arrested in the G<sub>2</sub> phase with BM41.440, the cdc2 kinase is dephosphorylated; however, cyclin B protein levels are significantly reduced (59). Additional experiments are needed to determine if the regulation of cyclin B levels is a direct or indirect consequence of the inhibition of PtdCho synthesis.

**Acknowledgments**—We thank Robyn Roberts, Huong Nguyen, and Margarita Pecha for expert technical assistance. We also thank Richard Ashmun for the flow cytofluorometry analysis.

#### REFERENCES

- Westphal, O. (1987) *Lipids* 22, 787–788
- Munder, P. G., Weltzein, H. U., and Modolell, M. (1977) *Immunology* 7, 411–424
- Berdel, W. E., Bausert, W. R. E., Weltzein, H. U., Modolell, M. L., Sidman, K. H., and Munder, P. G. (1980) *Eur. J. Cancer* 16, 1119–1204
- Runge, M. H., Andreesen, R., Pfeiderer, A., and Munder, P. G. (1980) *J. Natl. Cancer Inst.* 64, 1301–1306
- Andreesen, R., Modolell, M., Weltzein, H. U., Eibl, H., Common, H. H., Lohr, G. W., and Munder, P. G. (1978) *Cancer Res.* 38, 3894–3899
- Hoffman, D. R., Hoffman, L. H., and Snyder, F. (1986) *Cancer Res.* 46, 5803–5809
- Vallari, D. S., Smith, Z. L., and Snyder, F. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 1–8
- Vogler, W. R., Olson, A. C., Okamoto, S., Shoji, M., Raynoe, R. L., Kuo, J. F., Berdel, W. E., Eibl, H., Hajdu, J., and Nomura, H. (1991) *Lipids* 26, 1418–1423
- Noseda, A., Berens, M. E., Piantadosi, C., and Modest, E. J. (1987) *Lipids* 22, 878–883
- Andreesen, R., Modolell, M., and Munder, P. G. (1979) *Blood* 54, 519–523
- Berdel, W. E. (1991) *Br. J. Cancer* 64, 208–211
- Vogler, W. R., and Berdel, W. E. (1993) *J. Hemotherapy* 2, 93–102
- Daniel, L. W. (1993) in *Cancer Chemotherapy* (Hickman, J. A., and Tritton, T. R., eds) pp. 146–178, Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford
- Vallari, D. S., Record, M., Smith, Z. L., and Snyder, F. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 1006, 250–254
- Noseda, A., White, J. G., Godwin, P. L., Jerome, W. G., and Modest, E. J. (1989) *Exp. Mol. Pathol.* 50, 69–83
- Salari, H., Dryden, P., Howard, S., and Bittman, R. (1992) *Biochem. Cell Biol.* 70, 129–135
- Vallari, D. S., Austinhurst, R., and Snyder, F. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4261–4265
- Workman, P., Donaldson, J., and Lohmeyer, M. (1990) *Biochem. Pharmacol.* 41, 319–322
- Parker, J., Daniel, L. W., and Waite, M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 5385–5393
- Salari, H., Dryden, P., Davenport, R., Howard, S., Kones, K., and Bittman, R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1134, 81–88
- Heesbeen, E. C., Verdonck, L. F., Haagmans, M., van Heugten, H. G., Staal, G. E. J., and Ruksen, G. (1993) *Leuk. Res.* 17, 143–148
- Daniel, L. W., Etkin, L. A., Morrison, B. T., Parker, J., Morris-Natschke, S., Surles, J. R., and Piantadosi, C. (1987) *Lipids* 22, 851–855
- Xu, X. X., Tessner, T. G., Rock, C. O., and Jackowski, S. (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 1522–1533
- Seewald, M. J., Olsen, R. A., Sehgal, I., Melder, D. C., Modest, E. J., and Powis, G. (1990) *Cancer Res.* 50, 4458–4463
- Powis, G., Seewald, M. J., Gratas, C., Melder, D., Riebow, J., and Modest, E. J. (1992) *Cancer Res.* 52, 2835–2840
- Pawelczyk, T., and Lowenstein, J. M. (1993) *Biochem. Pharmacol.* 45, 493–497
- Downing, J. R., Margolis, B. L., Zilberman, A., Ashmun, R. A., Ulrich, A., Sherr, C. J., and Schlessinger, J. (1989) *EMBO J.* 8, 3345–3350
- Whetton, A. D., Monk, P. N., Consalvey, S. D., and Downes, C. P. (1986) *EMBO J.* 5, 3281–3286
- Hamilton, J. A., Veis, N., Bordun, A. M., Vairo, G., Gonda, T. J., and Phillips, W. A. (1989) *J. Cell. Physiol.* 141, 618–626
- Imamura, K., Dianoux, A., Nakamura, T., and Kufe, D. (1990) *EMBO J.* 9, 2423–2429
- Mollinedo, F., Martinez-Dalmau, R., and Modolell, M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 603–609
- Diomede, L., Colotta, F., Piovani, B., Re, F., Modest, E. J., and Samona, M. (1993) *Int. J. Cancer* 53, 124–130
- Modolell, M., Andreesen, R., Pahlke, W., Brugger, U., and Munder, P. G. (1979) *Cancer Res.* 39, 4681–4686
- Vogler, W. R., Whigham, E., Bennett, W. D., and Olson, A. C. (1985) *Exp. Hematol.* 13, 629–633
- Herrmann, D. B. (1985) *J. Natl. Cancer Inst.* 75, 423–430
- Hoffman, D. R., Thomas, V. L., and Snyder, F. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1127, 74–80
- Tronchere, H., Terce, F., Record, M., Ribbes, G., and Chap, H. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 157–165
- Boggs, K. P., Rock, C. O., and Jackowski, S. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 7757–7764
- Kent, C. (1990) *Prog. Lipid Res.* 29, 87–105
- Vance, D. E. (1989) in *Phosphatidylcholine Metabolism* (Vance, D. E., ed) pp. 225–239, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
- Esko, J. D., Wermuth, M. M., and Raetz, C. R. H. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7388–7393
- Voelker, D. R., and Kennedy, E. P. (1982) *Biochemistry* 21, 2753–2759
- Voelker, D. R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2669–2673
- Jamil, H., Yao, Z., and Vance, D. E. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4332–4339
- Jamil, H., Hatch, G. M., and Vance, D. E. (1993) *Biochem. J.* 291, 419–427
- Esko, J. D., Nishijima, M., and Raetz, C. R. H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 1698–1702
- Jackowski, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 3858–3867
- Morgan, C., Pollard, J. W., and Stanley, E. R. (1987) *J. Cell. Physiol.* 130, 420–427
- Schwarzbaum, S., Halpern, R., and Diamond, B. (1984) *J. Immunol.* 132, 1158–1162
- Tushinski, R. J., and Stanley, E. R. (1985) *J. Cell. Physiol.* 122, 221–228
- Rock, C. O., Cleveland, J. L., and Jackowski, S. (1992) *Mol. Cell. Biol.* 12, 2351–2358
- Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917
- Dean, P. N. (1980) *Cell Tissue Kinet.* 13, 299–308
- Leslie, C. C. (1995) in *Adv. Mol. Cell Biol.*, in press
- Geilen, C. C., Wieder, T., and Reutter, W. (1991) *J. Biol. Chem.* 267, 6719–6724
- Geilen, C. C., Wieder, T., Haase, A., Reutter, W., Morré, D. M., and Morré, D. J. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1211, 14–22
- Wieder, T., Geilen, C. C., and Reutter, W. (1993) *Biochim. J.* 291, 561–567
- Haase, R., Wieder, T., Geilen, C. C., and Reutter, W. (1991) *FEBS Lett.* 288, 129–132
- Hofmann, J., O'Connor, P. M., Jackman, J., Schubert, C., Ueberall, F., Kohn, K. W., and Grunicke, H. (1994) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 199, 937–943
- O'Conner, P. M., and Kohn, K. W. (1992) *Semin. Cancer Biol.* 3, 409–416
- Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. (1989) *Science* 246, 629–634
- Lock, R. B., and Ross, W. E. (1990) *Cancer Res.* 50, 3761–3766
- Lock, R. B., and Ross, W. E. (1990) *Cancer Res.* 50, 3767–3771
- Muschel, R. J., Zhang, H. B., Iliakis, G., and McKenna, W. G. (1991) *Cancer Res.* 51, 5113–5117
- Lock, R. B. (1992) *Cancer Res.* 52, 1817–1822
- Tsao, Y.-P., D'Arpa, P., and Liu, L. F. (1992) *Cancer Res.* 52, 1823–1829
- O'Connor, P. M., Ferris, D. K., White, G. A., Pines, J., Hunter, T., Longo, D. L., and Kohn, K. W. (1993) *Cell Growth & Differ.* 3, 43–52
- O'Connor, P. M., Ferris, D. K., Pagano, M., Draetta, G., Pines, J., Hunter, T., Longo, D. L., and Kohn, K. W. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 8298–8308

*A*

THIS PAGE BLANK (USPTO)



P.B.5818 – Patentlaan 2  
2280 HV Rijswijk (ZH)  
+31 70 340 2040  
TX 31651 epo nl  
FAX +31 70 340 3016

Europäisches  
Patentamt

Zweigstelle  
in Den Haag  
Recherchen-  
abteilung

European  
Patent Office

Branch at  
The Hague  
Search  
division

Office européen  
des brevets

Département à  
La Haye  
Division de la  
recherche

Wakerley, Helen Rachael  
Reddie & Grose,  
16 Theobalds Road  
London WC1X 8PL  
GRANDE BRETAGNE

HRW

JL

Datum/Date

27.02.01

Zeichen/Ref./Réf. HRW/40639	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n° 97909728.4-2107-JP9703997
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire TAKARA SHUZO CO. LTD.	

## COMMUNICATION

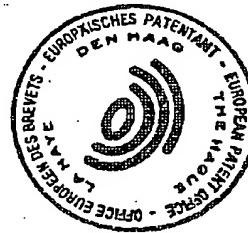
The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

- Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

## REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
X	WO 95 20944 A (KARLSHAMNS LIPIDTEKNIK AB ;CARLSSON ANDERS (SE); HERSLÖEF BENGT (S) 10 August 1995 (1995-08-10) * page 8, line 28 - page 9, line 9 * * page 10, line 6 - line 32 * ---	1-14	A61K35/78 A61K35/80 A61K35/84 A61K35/66 A61K35/56 A23L1/30
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 09, 31 October 1995 (1995-10-31) & JP 07 155151 A (TOKUSHIMA PREF GOV), 20 June 1995 (1995-06-20) * abstract * ---	1-14	
X	EP 0 693 547 A (NESTLE SA) 24 January 1996 (1996-01-24) * examples 1-12; table 1 * ---	1-14	
X	MURAKAMI AKIRA ET AL: "Glyceroglycolipids from Citrus hystrix, a traditional herb in Thailand, potently inhibit the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse skin." JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 43, no. 10, 1995, pages 2779-2783, XP002100385 ISSN: 0021-8561 * conclusions * -----	1-14	
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
2	Place of search  MUNICH	Date of completion of the search  5 February 2001	Examiner  Pilling, S
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons ..... & : member of the same patent family, corresponding document	
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document			

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT  
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 97 90 9728

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.  
 The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
 The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

05-02-2001

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520944	A	10-08-1995	AU 691248 B 14-05-1998
			AU 1723395 A 21-08-1995
			AU 691249 B 14-05-1998
			AU 1723495 A 21-08-1995
			AU 691250 B 14-05-1998
			AU 1723595 A 21-08-1995
			BR 9506681 A 18-11-1997
			CA 2182575 A 10-08-1995
			CA 2182576 A 10-08-1995
			CA 2182577 A 10-08-1995
			CN 1140405 A 15-01-1997
			CN 1140406 A 15-01-1997
			CN 1144478 A 05-03-1997
			CZ 9602215 A 13-11-1996
			DE 797432 T 19-02-1998
			EP 0797432 A 01-10-1997
			EP 0744939 A 04-12-1996
			EP 0743851 A 27-11-1996
			ES 2107397 T 01-12-1997
			FI 963064 A 30-09-1996
			FI 963065 A 30-09-1996
			FI 963066 A 30-09-1996
			GR 97300049 T 30-01-1998
			HU 75464 A 28-05-1997
			HU 75470 A 28-05-1997
			HU 75459 A 28-05-1997
			JP 9508413 T 26-08-1997
			JP 9508414 T 26-08-1997
			JP 9508415 T 26-08-1997
			KR 220546 B 15-09-1999
			LV 11726 A 20-04-1997
			LV 11726 B 20-10-1997
			NO 963240 A 02-08-1996
			NO 963241 A 02-08-1996
			NO 963242 A 02-08-1996
			NZ 279952 A 26-02-1998
			NZ 279953 A 26-02-1998
			NZ 279954 A 26-02-1998
			PL 315778 A 09-12-1996
			PL 315779 A 09-12-1996
			PL 315780 A 09-12-1996
			WO 9520943 A 10-08-1995
			WO 9520945 A 10-08-1995
			US 6022561 A 08-02-2000
			US 5716639 A 10-02-1998
			US 5688528 A 18-11-1997

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT  
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 97 90 9728

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

05-02-2001

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9520944 A		ZA	9500939 A	09-10-1995
		ZA	9500940 A	09-10-1995
JP 07155151 A	20-06-1995	JP	7121211 B	25-12-1995
EP 0693547 A	24-01-1996	AU	684959 B	08-01-1998
		AU	2506795 A	08-02-1996
		BR	9503405 A	27-02-1996
		CA	2154232 A	24-01-1996
		CN	1120573 A	17-04-1996
		JP	8060151 A	05-03-1996
		US	5714094 A	03-02-1998
		ZA	9506103 A	27-02-1996

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 <b>A61K 35/78, 35/80, 35/84, 35/66, 38/00</b>	A1	(11) 国際公開番号 <b>WO98/20884</b>
		(43) 国際公開日 <b>1998年5月22日(22.05.98)</b>
(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP97/03997</b>		
(22) 国際出願日 <b>1997年10月31日(31.10.97)</b>		
(30) 優先権データ 特願平8/311224 特願平8/356416	1996年11月8日(08.11.96) 1996年12月26日(26.12.96)	JP JP
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)		小山信人(KOYAMA, Nobuto)[JP/JP] 巽 容子(TATSUMI, Yoko)[JP/JP] 佐川裕章(SAGAWA, Hiroaki)[JP/JP] 猪飼勝重(IKAI, Katsuhige)[JP/JP] 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒520-21 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社 中央研究所内 Shiga, (JP)
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 酒井 武(SAKAI, Takeshi)[JP/JP] 于 福功(YU, Fu-Gong)[CN/JP] 〒036 青森県弘前市大字在府町82番地4 寶酒造株式会社 バイオ弘前研究所内 Aomori, (JP)		(74) 代理人 弁理士 安達光雄, 外(ADATI, Mituo et al.) 〒550 大阪府大阪市西区土佐堀1丁目6番20号 新栄ビル6階 Osaka, (JP)
		(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 歐州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
		添付公開書類 国際調査報告書

(54)Title: APOPTOSIS INDUCERS

(54)発明の名称 アポトーシス誘発剤

(57) Abstract

Apoptosis inducers or carcinostatic agents characterized by containing as the active ingredient glycerolipids and/or glyceroglycolipids.

グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とすることを特徴とするア  
ポトーシス誘発剤又は制がん剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジラント
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チヨード
AU	オーストラリア	GB	英國	MC	モナコ	TG	トーゴー
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TR	トルコ
BE	ベルギー	GN	ギニア	ML	ラヴィア共和国	TT	トリニダッド・トバゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサオ	MN	マリ	UG	ウクライナ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	UAG	ウガンダ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MW	モラウイ	USS	米国
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	NE	ニジエール	VVN	ヴィエトナム
CA	カナダ	IL	イスラエル	NL	オランダ	YU	ユーゴースラヴィア
CF	中央アフリカ	IS	イスラマンド	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CG	コンゴ共和国	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド		
CH	スイス	JP	日本	PL	ポーランド		
CI	コートジボアール	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KG	キルギス	RU	ルーマニア		
CN	中国	KP	北朝鮮	RDE	ロシア		
CU	キューバ	KR	韓国	SSS	スタン		
CY	キプロス	KZ	カザフスタン	SEG	スウェーデン		
CZ	チェコ	LC	セント・ルシア	SSS	シンガポール		
DE	ドイツ	LI	セント・ルシティン	SSS	スロヴェニア		
DK	デンマーク	LK	シリビテ・ランカ	SSS	スロ伐キア		
EE	エストニア	LR	スリベリア	SK	スロヴァキア		
ES	スペイン	LS	レソト	SL	シエラ・レオーネ		

## 明細書

## アポトーシス誘発剤

## 発明の属する技術分野

本発明は、健康増強に有用な植物、微生物又は動物由来の生理活性物質を有効成分とし、医薬として有用なアポトーシス誘発剤、制がん剤、該生理活性物質を含有する機能性食品又は飲料、及びこれらの製造方法に関する。

## 従来の技術

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を基にプログラム死遺伝子タンパク質が合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要若しくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

近年、セラミドを中心とするスフィンゴ脂質とアポトーシスの関連が注目され、パルミチン酸、ステアリン酸によりセラミドのデノボ (de novo) 合成が起こり、それによってアポトーシスが誘導されることも報告されている [ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第 272 卷、第 3324~3329 頁 (1997)]。

## 発明が解決しようとする課題

セラミドや遊離脂肪酸はアポトーシス誘発剤としての開発が期待されているが

、生体由来の他の脂溶性物質のアポトーシス誘発作用は全く不明である。

本発明の目的は、植物、微生物又は動物由来のアポトーシスを誘発する作用を有する安全性の高い抽出画分を開発し、該画分を含有するアポトーシス誘発剤、制がん剤、該画分を構成成分とする機能性食品又は飲料、及びそれらの製造方法を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、かかる目的を達成するために鋭意検討した結果、植物、微生物又は動物より得られるグリセロ脂質、グリセロ糖脂質が強いアポトーシス誘発作用、制がん作用を有することを見出し、本発明を完成させた。

即ち、本発明の第1の発明はアポトーシス誘発剤に関し、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とすることを特徴とする。

本発明の第2の発明は制がん剤に関し、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とすることを特徴とする。

本発明の第3の発明は本発明の第1又は第2の発明の剤の製造方法に関し、本発明の第1又は第2の発明の剤の製造方法において、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第4の発明はグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなるアポトーシス誘発用食品又は飲料に関する。

本発明の第5の発明はグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなる制がん用食品又は飲料に関する。

本発明の第 6 の発明は本発明の第 4 又は第 5 の発明の食品又は飲料の製造方法に関し、本発明の第 4 又は第 5 の発明の食品又は飲料の製造方法において、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は透析内液の D E A E - S e p h a r o s e F a s t F l o w カラムによる溶出パターンを示す図である。

図 2 は B 画分及び精製物のアポトーシス誘発作用を示す図である。

図 3 は精製物の N M R スペクトルを示す図である。

図 4 は試料 A の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 5 は試料 B の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 6 はセファロース L H - 6 0 カラムクロマトグラフィーを示す図である。

図 7 は分画番号 2 0 の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 8 は分画番号 2 1 の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 9 は分画番号 2 3 の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 1 0 は分画番号 2 0 の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 1 1 は分画番号 2 1 の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 1 2 は分画番号 2 3 の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 1 3 はクロロホルム溶出画分の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 1 4 はクロロホルムとアセトンの比が 8 0 : 2 0 の溶出画分の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 1 5 はクロロホルム溶出画分の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 1 6 はクロロホルムとアセトンの比が 8 0 : 2 0 の溶出画分の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図 1 7 は R f 値約 0. 2 5 のスポットの脂質成分の全イオンクロマトグラムを

示す図である。

図18はR<sub>f</sub>値約0.25のスポットの糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図19はR<sub>f</sub>値約0.33のスポットの脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図20はR<sub>f</sub>値約0.33のスポットの糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図21はブナシメジのエタノール抽出液中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図22はブナシメジのエタノール抽出液中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図23は抹茶のエタノール抽出液中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図24は抹茶のエタノール抽出液中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図25は米糠の75%エタノール抽出物中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図26は米糠の75%エタノール抽出物中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

## 発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明で使用するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は特に限定ではなく、植物、微生物又は動物から製造しても良く、また化学的に合成しても良い。

本発明において使用できる植物、微生物又は動物としては、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物であれば良く、特に限定はないが、植物としては、例えば、ほうれん草、人参、タマネギ等の野菜類、茶類等の双子葉植物、麦、米等の单子葉植物、コショウ、

ナツメッグ、ニンニク、ローリエ、セロリー、マスタード、ショウガ、トウガラシ、タイム、サフラン、シナモン、バニラ、オールスパイス、カラシ、クレソン、サンショウ、シソ、ハーブ、八角、バジル、ニラ、ホップ、ワサビ等の香辛料原料、穀物カス等のこれらの植物加工物、褐藻類、紅藻類、緑藻類、単細胞緑藻類等の藻類、微生物としてはキノコ類、酵母、糸状菌、例えば麹菌、細菌、例えば納豆菌、乳酸菌、動物としては脊椎動物又は無脊椎動物等が例示される。

本明細書でいう茶類とは、一般に茶と呼ばれるものであればよく、例えば非発酵茶として、緑茶、煎茶、番茶、ほうじ茶、抹茶が、半発酵茶として、パイパオ茶、ウーロン茶、パオチョン茶が、発酵茶として紅茶が、後発酵茶としてプアール茶が挙げられる。このほかに、マテ茶、クコ茶、ハトムギ茶、麦茶等もここでいう茶類に含まれる。

本明細書でいうキノコ類とは、特に限定は無いが、一般に食されているものであるのが好ましく、例えば、ブナシメジ、ハタケシメジ、シイタケ、マツタケ、ホンシメジ、エノキタケ、ナメコ、イワタケ、キクラゲ、キヌガサタケ、クリタケ、クロカワ、コウタケ、ショウロ、タマゴタケ、チチタケ、ナラタケ、ハツタケ、ヒラタケ、マイタケ、マツオウジ、マッシュルーム等の担子菌類、冬虫夏草等の子のう菌類が例示される。

本明細書でいう藻類とは、特に限定は無いが、フクロノリ、モズク、真昆布、ガゴメ昆布、ワカメ、アラメ、ヒジキ等の褐藻類、テングサ、イギス等の紅藻類、アオサ、カワノリ、ミル等の緑藻類、クロレラ等の単細胞緑藻類等が例示される。

本明細書でいう穀物カスとは、特に限定は無いが、米糠、小麦ふすま、麦根、おから等が例示される。

本発明においては食品として利用されている、これらの茶類、キノコ類、藻類、穀物カスより、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を調製し、アポトーシス誘発剤、制がん剤、機能性食品又は飲料の有効成分として使用することが好ましい。

本発明において使用するアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質、グリセロ糖脂質は特に限定ではなく、グリセロ脂質としてはモノー、ジー及びトリーアシルグリセロールが使用でき、グリセロ糖脂質としては疎水性部分にグリセロールをもつ糖脂質、例えば疎水性基としてはモノアシル基、ジアシル基、アルキルアシル基、ジアルキルアシル基、アルケニルアシル基、ジビフィタニルエーテル等の疎水基を有するグリセロ糖脂質、例えば中性グリセロ糖脂質としてはモノガラクトシルジアシルグリセロール、モノグリコシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロール、ジグリコシルジアシルグリセロール、ジマンノシルジアシルグリセロール、トリグリコシルジアシルグリセロール、テトラグリコシルジアシルグリセロール、ポリグリコシルジアシルグリセロール、酸性グリセロ糖脂質としてはセノリピド、スルホキノボシルジアシルグリセリド、グルクロノシルジアシルグリセロール、グルコシルービスホスファチジルグリセロール、ホスファチジルグルコシルジアシルグリセロール、グリセロホスホリルジグルコシルジアシルグリセロール、リポテイコ酸等が使用できる。

本発明で使用するグリセロ脂質、グリセロ糖脂質の構成脂肪酸は飽和及び／又は不飽和脂肪酸、例えばテトラデカン酸（ミリスチン酸、C<sub>14</sub>:0）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸、C<sub>16</sub>:0）、テトラデセン酸（ミリストレン酸、C<sub>14</sub>:1）、ヘキサデセン酸（パルミトレイン酸、C<sub>16</sub>:1）、オクタデセン酸（オレイン酸、C<sub>18</sub>:1）、シス-9,シス-12-オクタデカンジエン酸（リノレン酸、C<sub>18</sub>:2）、9,12,15-オクタデカトリエン酸（リノレン酸、C<sub>18</sub>:3）等が例示され、構成糖としてはフコース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルクロン酸、グルコース、ガラクトース、マンニトール、ミオイノシトール等が例示される。またグリセロ糖脂質としては糖脂質と糖類及び／又はタンパク質との複合体等が包含される。

本発明に使用する植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は有機溶媒、例えば含水親水性有機溶媒

、例えば含水エタノールによる抽出工程を包含する製造方法により、簡便に製造することができるが、当該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の製造方法においては特に限定ではなく、単なる水抽出を含め、当該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の精製に使用できる公知の方法を使用することができる。また植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を化学的、物理的、又は酵素学的に処理した後に、目的のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を精製しても良い。精製に際しては、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の理化学的性質、又はアポトーシス誘発作用、制がん作用等の生理活性を指標にして精製しても良い。

本発明において、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は有機溶媒、例えばヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、又はアセトン、プロパノール、エタノール、メタノール等の親水性有機溶媒、これらの混合溶媒、又はこれらと水との混合溶媒で抽出され、例えば含水エタノールによる抽出工程を包含する製造方法により、食品に適したグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を簡便に製造することができる。食品又は飲料に使用する場合、好適には抽出条件として、有機溶媒、特に親水性有機溶媒、例えば10～95%、好ましくは20～80%エタノール水溶液で、通常数分～数日間、好ましくは數十分から數十時間、通常10°C～70°C、好ましくは20～60°Cで抽出することにより効率よくアポトーシス誘発化合物であるグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が抽出される。また、有機溶媒、特に親水性有機溶媒で抽出する前に、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を酸、又はアルカリで処理することにより、更に効率よくアポトーシス誘発化合物であるグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が抽出される。

本発明で使用するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の純化されたものを採取する方法としては、ブライーダイアー（B l i g h - D y e r）法、フォルチ（F o l c h）分配法等の公知の方法（日本生化学会編、新生化学実験講座、第4巻、脂質 I I I 、糖脂質、第104～109頁、1990年、東京化学同人

) があり、目的に応じ、本発明で使用するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の抽出に用いることができる。

本発明において使用するグリセロ脂質、グリセロ糖脂質の精製においては、上記抽出物を疎水性担体、逆相担体、順相担体等を用いたクロマトグラフィーにかけることにより、更に効率よく分離することができる。

疎水性担体としての限定は無く、公知の担体を使用すれば良いが、該担体としてはブチル基、オクチル基、フェニル基を導入したセファクリル系、セファロース系、トヨパール系等の樹脂、XAD-1、2、4、200、7、8等のアンバーライト吸着樹脂等が例示される。また逆相担体としての限定は無く、公知の担体を使用すれば良いが、該担体としてはアルキル鎖を共有結合させたシリカゲルが例示される。更に順相担体としての限定は無く、公知の担体を使用すれば良いが、該担体としてはシリカゲルが例示される。なお精製に際しては、グリセロ脂質、グリセロ糖脂質の理化学的性質、又はアポトーシス誘発作用、制がん作用等の生理活性を指標にして精製することができる。

本発明で使用する植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は例えば食用植物、食用微生物、食用動物の含水エタノール抽出物から通常のイオン交換樹脂処理、疎水クロマト処理、ゲルろ過処理等で精製することができる。

一般的には、植物、微生物又は動物中のグリセロ脂質、グリセロ糖脂質は膜近辺に糖類及び／又はタンパク質と結合した高分子の形態で存在している場合が多く、例えば熱水で抽出することによりグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質と糖類及び／又はタンパク質が結合したグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を得ることができる。なお糖類とは植物、微生物又は動物中に存在する糖質であり、単糖、オリゴ糖、多糖、複合糖質を包含する。

本発明においてはこのように得られた高分子のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物をそのまま用いても良いが、使用目的に応じて、糖類及び／又はタンパク質を酵素的、化学的、及び／又は物理的に処理し、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を精製、採取することにより、より純化されたグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を得ることが可能である。

上記方法で得られた本発明で用いられるグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物は天然より得られる安全性の高い物であり、食品及び／又は飲料用として特に有用である。

得られたグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質はモノクローナル抗体等の標的細胞を認識するリガンドと結合させることにより、任意の標的細胞に特異的にアポトーシスを誘発させることができる。また標的細胞ががん細胞の場合は目的のがん細胞に選択的にアポトーシスを誘発させ制がん作用を発揮することができる。更にアルブミン等の担体と本発明の化合物を結合させることにより、より吸収性の高い物質が提供される。

本発明のアポトーシス誘発剤は、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればよい。一般的には、本発明のアポトーシス誘発化合物、例えばグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

本発明のアポトーシス誘発剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターク、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤滑剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるアポトーシス誘発性を有する、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明のアポトーシス誘発剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も含まれられる。

本発明のアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当たり0.1～200mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明に使用するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質はがん細胞増殖抑制

活性を有する。本発明に使用するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質のがん細胞増殖抑制の作用機作は、本発明を何ら限定するものではないが、例えばがん細胞に対するアポトーシス誘発作用も本発明に包含される。

制がん作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。一般的には、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

制がん剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによつても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

制がん剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

制がん剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当たり0.1～200mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明の薬剤はがん疾患等の治療剤として用いることができる。また本発明のアポトーシス誘発剤により提供されるアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん等の疾患との関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。特に、食品として長い歴史を有する植物、微生物又は動物より調製したアポトーシス誘発化合物であるグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は、経口投与の場合において、安全性の高いものである。また本発明のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は当然安全性は高く、そのアポトーシス誘発作用、アポトーシス誘発作用による制がん作用等により、消化器系がん等の症状改善、予防に極めて有用である。

本発明の食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆等）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料等）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類等）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウォッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュール等）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料等）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりん等）、香辛料（ニンニク、コショウ、トウガラシ、ナツメッグ、ショウガ、八角、ハーブ、バジル等の抽出物等）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥又は濃縮食品（レバーペース

ト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類)、乾燥食品(即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープ等)、冷凍食品(すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種ステイック、フルーツカクテル等)、固形食品、液体食品(スープ等)、香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料にグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有されていれば良い。

調理及び加工においては、調理、加工後にアポトーシス誘発性を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有されていれば良い。

すなわち調理・加工前、調理・加工時、更には調理・加工後にアポトーシス誘発性を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を添加してもよいし、調理・加工品やその材料を、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物に添加し、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を希釀してもよい。

次に食品又は飲料の製造においては、任意の工程でアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有させねば良い。含有させる方法としては該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を添加してもよいし、食品又は飲料やその原料を、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質に添加し、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を希釀してもよい。また、添加は1回又は数回に渡って行ってもよい。したがって、アポトーシス誘発作用を有する食品又は飲料を簡便に製造することができる。いずれの工程を経た場合も、アポトーシス誘発性を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有する食品又は飲料、本発明のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を添加及び／又は希釀し

てなる食品又は飲料は本発明の食品又は飲料と定義される。

本発明のアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の食品中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えば該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の含有量は食品 100 部当り  $10^{-9}$  部以上、食品としての官能、生理作用の面からは好ましくは  $10^{-8}$  ~ 5 部、更に好ましくは  $10^{-7}$  ~ 2 部である。

本発明のアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の飲料中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えば該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の含有量は飲料 100 部当り  $10^{-9}$  部以上、食品としての官能、生理作用の面からは好ましくは  $10^{-8}$  ~ 5 部、更に好ましくは  $10^{-7}$  ~ 2 部である。なお、本明細書において部は重量部を意味する。

本発明の食品又は飲料としては、本発明のアポトーシス誘発性を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

本発明の食品又は飲料は生理活性を有する本発明のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を多量に含有し、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の有するアポトーシス誘発作用によって、これらを摂取することにより発がん予防、がん抑制効果を有する健康食品又は飲料であり、特に胃腸健康保持に有用な食品又は飲料である。

本発明のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物及び／

又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなる制がん用食品又は制がん用飲料は上記アポトーシス誘発用食品又はアポトーシス誘発用食品の製造方法に準じ、その制がん活性を指標に製造することができる。

本発明のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は植物、微生物又は動物由来であり、特に食用植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の食品又は飲料への使用は極めて安全性に優れたものであり、当該アポトーシス誘発化合物は生理的機能発現濃度において動物に対する毒性は認められない。

食用植物、微生物又は動物中の本発明のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は食品として長い歴史を有するものであり、これらから調製した本発明のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物は、経口投与の場合において、極めて安全性の高いものである。したがって、当該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は当然安全性は高く、そのアポトーシス誘発作用により消化器系がん等の予防、治療に極めて有用である。

以上、本発明により生体脂質であるグリセロ脂質及びグリセロ糖脂質がアポトーシス誘発活性、制がん活性を有することが明らかとなった。

本発明に使用するアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は植物、微生物又は動物の膜画分に多量に存在し、特に食用植物又は微生物より安価にかつ簡便に製造できる。またその疎水性の度合いにより、好適な溶媒を選択することにより、目的のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を選択的に精製することができる。

本発明に使用するアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖

脂質は、そのアポトーシス誘発作用、制がん作用を食品又は飲料に簡便に付与することができ、本発明のアポトーシス誘発性、制がん性をもつグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は食品又は飲料への添加剤として極めて有用である。

### 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

#### 実施例 1

##### 海藻からのアポトーシス誘発作用を有する組成物の調製

(1) ガゴメ昆布を充分乾燥後、乾燥物 20 kg を自由粉碎機（奈良機械製作所製）により粉碎した。

水道水 900 リットルに塩化カルシウム二水和物（日本曹達社製）7.3 kg を溶解し、次にガゴメ昆布粉碎物 20 kg を混合した。液温 12°C から液温 90 °C となるまで水蒸気吹込みにより 40 分間昇温させ、次いでかくはん下 90 ~ 95 °C に 1 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 1100 リットルを得た。

次いで固液分離装置（ウエストファリアセパレーター社製 CNA 型）を用い、冷却物の固液分離を行い、約 900 リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液 360 リットルをダイセル社製 F E 10 - F C - F U S 0 3 8 2 (分画分子量 3 万) を用い、20 リットルまで濃縮した。次いで水道水を 20 リットル加え、また 20 リットルまで濃縮するという操作を 5 回行い、脱塩処理を行い、ガゴメ昆布由来の抽出液 25 リットルを調製した。

該溶液 1 リットルを凍結乾燥し、乾燥物 13 g を得た。

(2) 実施例 1 - (1) 記載の抽出液 1.4 リットルを、0.2 M CaCl<sub>2</sub> 含有 20 mM 酢酸緩衝液、pH 6 で透析し、透析内液を得た。DEAE-Sephadex Fast Flow カラム (φ 14 cm × 45.5 cm) を同緩

衝液にて平衡化し、透析内液をアプライ後、同緩衝液で洗い、2 MN a C 1 含有同緩衝液にて濃度勾配法により溶出させた。フェノール硫酸法及びカルバゾール硫酸法にて、総糖含量及びウロン酸含量を求め、溶出順にA画分、B画分及びC画分を得た。これらを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥し、B画分 760 mg を得た。

このB画分にアポトーシス誘発活性が認められた。

図1に抽出液のD E A E - S e p h a r o s e F a s t F l o wカラム溶出パターンを示す。すなわち図1は海藻由来抽出物のD E A E - S e p h a r o s e F a s t F l o wカラム ( $\phi 14\text{ cm} \times 45.5\text{ cm}$ ) の溶出パターンを示す図であり、縦軸はカルバゾール硫酸法での530 nmの吸光度、フェノール硫酸法での480 nmの吸光度、及び電導度 (mS/cm) 、横軸はフラクション番号を示し、図中白丸印がフェノール硫酸法での480 nmの吸光度、黒丸印がカルバゾール硫酸法での530 nmの吸光度、図中実線が電導度を示す。なお1フラクションの液量は1000 mlである。

(3) 上記方法にて分画したB画分 8.6 g を最終濃度1 MN a C 1 に調製し、1 MN a C 1 で平衡化したP h e n y l - S e p h a r o s e 6 F a s t F l o wカラム ( $\phi 4.4\text{ cm} \times 20\text{ cm}$ ) にアプライした。1 MN a C 1 でカラムを洗浄後、水への濃度勾配により溶出される画分を得た。これをロータリーエバポレーターにて濃縮後、蒸留水に対して透析し、約6.5 ml の精製画分を得た。精製画分を凍結乾燥し、精製物 60 mg を得た。この精製物にアポトーシス誘発活性が認められた。

#### (4) 精製物のアポトーシス誘発作用の測定

上記B画分、及び実施例1-(3)記載の精製物につきアポトーシス誘発活性を以下の通りに測定した。牛胎児血清10%を含有するR P M I 1640培地にて培養したH L - 60 (ATCC CCL-240)  $2.5 \times 10^5$  個/4.5

m l に、B 画分又は該精製物の水溶液 0.5 m l を添加し、37°C、48 時間培養した。同時に对照試料として、蒸留水及びアポトーシス誘発活性を有することが判っているアクチノマイシンD 溶液 (10 μg/m l) を添加した。光学顕微鏡下で、アポトーシス小体の形成、細胞の収縮、核の凝縮を肉眼観察し、生細胞数をカウントした。これらの現象が観察され、生細胞数の減少が認められるものを、アポトーシス誘発活性有りと判断した。

B 画分、精製物及びアクチノマイシンD 添加においてアポトーシス誘発作用が確認された。その結果を図2に示す。すなわち図2は上記 HL-60 細胞の培養液に最終濃度 2 mg/m l のB 画分又は最終濃度 0.9 mg/m l の精製物を添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間（時間）、縦軸は培養液中の生細胞数 ( $\times 10^5$  個/5 m l) を示す。図中白四角形印は水添加の対照、白ひし形印はB 画分添加、白丸印は精製物添加をそれぞれ示す。

#### (5) アポトーシス誘発作用を有する精製物の理化学的性質

実施例1-(3)記載の精製物の理化学的性質を測定した。

##### (i) NMR 分析

J NM-A 500 核磁気共鳴装置（日本電子社製）を用いて  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した。

その結果を図3で表される  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルで示した。図3において縦軸はシグナルの強度、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。なお、 $^1\text{H-NMR}$  での化学シフト値は HOD の化学シフト値を 4.65 ppm として表した。

##### $^1\text{N-NMR}$ (D<sub>2</sub>O)

$\delta$  0.7 (脂肪酸の末端のメチルの H)、1.1 (脂肪酸のメチレン及びフコースの C-5位のメチルの H)、3.1 ~ 5.6 (糖に由来する H)

##### (ii) GC-MS 分析

実施例 1 - (3) 記載の精製物 2 mg を取り、5% 塩酸メタノール溶液 1 ml を加え封管し、85°C で 3 時間加熱した。冷後、n-ヘキサン 1 ml で 3 回抽出し、得られた n-ヘキサン抽出液を窒素気流で約 500 μl に濃縮し、試料 A とした。

残りのメタノール層に炭酸銀を加え中和した後、ろ過し、ろ液に窒素気流を吹付けて濃縮乾固し、真空ポンプで 4 時間乾燥した。乾燥後、残渣に TMS 試薬（ヘキサメチルジシラザン 2.6 ml を乾燥ピリジン 2.0 ml に加え、次いでトリメチルクロルシリラン 1.6 ml を加えた後、生じた白濁物質を遠心分離して除いた上清を使用）5 滴を加え、室温に 30 分間放置した。次いで、50°C で 10 分間加温し、冷後、クロロホルム 1 ml を加えかくはん後、クロロホルム層を水 1 ml で 3 回洗浄した。得られたクロロホルム溶液を試料 B とした。

上記、試料 A 及び B を DX-302 質量分析計（日本電子社製）を用いて下記条件で GC-MS 分析に供した。

#### 試料 A

カラム：TC-1（ジーエルサイエンス）30 m × 0.25 mm I.D.

温度：130 °C から 250 °C まで 4°C/min の昇温、250 °C で 5 分間の維持

流量：ヘリウムガス、1.2 ml/min

マススペクトル測定質量範囲：m/z 50～500

マススペクトル測定繰り返し時間：3 秒

#### 試料 B

カラム：TC-1（ジーエルサイエンス）30 m × 0.25 mm I.D.

温度：130 °C から 300 °C まで 4°C/min の昇温、300 °C で 5 分間の維持

流量：ヘリウムガス、1.2 ml/min

マススペクトル測定質量範囲：m/z 50～800

マススペクトル測定繰り返し時間：3 秒

その結果、試料 A、試料 B はそれぞれ図 4、図 5 で表される全イオンクロマト

グラムを示した。各図において縦軸は相対強度（%）、横軸上部は保持時間（分）、下部はスキャン番号を示す。

試料A、試料Bより得られたクロマトグラム中のピークの構造の確認はそれぞれのピークのマススペクトルを解析することにより行った。

試料Aからは主成分としてテトラデカン酸（ミリスチン酸）（ピーク2）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸）（ピーク3）、及びテトラデセン酸（ピーク1）の各メチルエステルが確認された。

また、試料Bからはグリセロール由来のピーク（ピーク1）、フコース由来のピーク（ピーク2、3、4）、キシロース由来のピーク（ピーク5、6）、マンノース由来のピーク（ピーク7）、ガラクトース由来のピーク（ピーク8、9、10）、及びグルクロン酸由来のピーク（ピーク11）が確認された。

以上、上記精製物にはグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有されていることが判明した。

## 実施例2

(1) 乾燥ガゴメ昆布の粉碎物2kgを20リットルの80%エタノール中に懸濁し、25°Cで3時間かくはんし、濾過により可溶物を除去した。得られた残さを、1.5ユニットのエンド型フコース硫酸含有多糖分解酵素(WO 97/26896参照)、10%のエタノール、100mM塩化ナトリウム、50mM塩化カルシウムを含む20リットルの緩衝液(pH 8.2)に懸濁し、25°Cで24時間かくはんした。次にこのかくはん液をろ過し、残さを50mM塩化ナトリウムを含む10%エタノールで洗浄した。洗浄された残さを4gのアルギン酸リーゼ(ナガセ生化学工業社製)、100mMリン酸二水素ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、及び10%エタノールを含む緩衝液(pH 6.6)40リットルに懸濁し、25°Cで96時間かくはんした。この溶液を遠心分離し、得られた上清を排除分子量10万のホローファイバーを装着した限外ろ過器により濃縮後、100mM塩化ナトリウムを含む10%エタノールで溶液を置換した。こ

の溶液に等量の0.4M酢酸カルシウム溶液を添加し、30分かくはん後、遠心分離し、得られた上清を上記と同条件で限外ろ過し、100mM塩化ナトリウムで溶液を置換した。この溶液に1Mとなるように塩化ナトリウムを添加し、pH8に調製し、ガゴメ昆布よりの抽出液1.4リットルを得た。

この抽出液を、1M塩化ナトリウムであらかじめ平衡化した2.9リットルのフェニルセルロファイン（生化学工業社製）カラムにかけ、6リットルの1M塩化ナトリウム、6リットルの水、8リットルのエタノールの順で溶出した。

各溶出画分のアポトーシス誘発作用を実施例1-(4)記載の方法で測定し、エタノール溶出画分にアポトーシス誘発作用及びがん細胞増殖抑制作用が認められた。

エタノール溶出画分を濃縮乾固後、エタノールに溶解して175mlとし、そのうち58mlを、あらかじめエタノールで平衡化した1130mlのセファロースLH-60（ファルマシア社製）カラムにかけてエタノールで溶出し、60mlずつ分取した。

溶出パターンを図6に示す。すなわち図6はセファロースLH-60カラムクロマトグラフィーを示す図であり、縦軸は230nmの吸光度、横軸は分画番号を示す。

溶出画分のアポトーシス誘発活性を実施例1-(4)記載の方法で測定したところ、分画番号8~15の分画、27~49の分画には活性は無く、分画番号16~21、22~26の各々の分画にアポトーシス誘発作用及びがん細胞増殖抑制作用が認められた。

この活性の強い分画のうち3分画（分画番号20、21、23）について、実施例1記載の方法で各種成分の分析を行った。

図7、8、9、10、11、12に分画番号20、21、23の各々の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図7、8、9は分画番号20、21、23の各々の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図10、11、12は分画番号20、21、23の各々の糖の成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度（%）、横軸上部

は保持時間（分）、下部はスキャン番号を示す。

図7、10に示すように、分画番号20の分画からはテトラデカン酸（ミリスチン酸）（図7ピーク1）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸）（図7ピーク3）、ヘキサデセン酸（図7ピーク2）、及びオクタデセン酸（オレイン酸）（図7ピーク4）のそれぞれのメチルエステル、グリセロール由来のピーク（図10ピーク1）、ガラクトース由来のピーク（図10ピーク2、3、4）が検出された。また図8、図11に示すように分画番号21の分画からはテトラデカン酸（ミリスチン酸）（図8ピーク1）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸）（図8ピーク3）、ヘキサデセン酸（図8ピーク2）、及びオクタデセン酸（オレイン酸）（図8ピーク4）のそれぞれのメチルエステル、グリセロール由来のピーク（図11ピーク1）、ガラクトース由来のピーク（図11ピーク2、3、4）が検出された。

また図9、図12に示すように分画番号23の分画からはヘキサデカン酸（パルミチン酸）（図9ピーク1）、及びオクタデセン酸（オレイン酸）（図9ピーク2）の各々のメチルエステル、グリセロール由来のピーク（図12ピーク1）、ガラクトース由来のピーク（図12ピーク2、3、4）が検出された。

以上、上記分画にはグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有されていることが確認され、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質がアポトーシス誘発活性及びがん細胞増殖抑制活性を有することが明らかとなった。

(2) 実施例2-(1)に記載のセファロースLH-60カラム溶出画分の分画番号16～26を集め、濃縮乾固後、乾固物をクロロホルムに溶解し、あらかじめクロロホルムで平衡化した200mLのイアトロビーズ 6RS-8060(ヤトロン社製)カラムにかけ、クロロホルムで溶出し、次いでクロロホルムとアセトンの比が80:20、60:40、40:60、20:80の混合物で順次溶出させた。その結果、クロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が80:20の溶出画分に強いアポトーシス誘発活性を確認した。

アポトーシス誘発活性が確認された画分に関して実施例 1 に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図 1 3、1 4、1 5、1 6 にクロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が 80 : 20 の溶出画分の各々の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図 1 3、1 4 はクロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が 80 : 20 の溶出画分の各々の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図 1 5、1 6 はクロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が 80 : 20 の溶出画分の各々の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度 (%)、横軸上部は保持時間 (分)、下部はスキャン番号を示す。

図 1 3、1 5 に示すように、クロロホルム溶出画分からはヘキサデカン酸 (パルミチン酸) (図 1 3 ピーク 1) のメチルエステル、グリセロール由来のピーク (図 1 5 ピーク 1) が検出された。また図 1 4、1 6 に示すようにクロロホルムとアセトンの比が 80 : 20 の溶出画分からはテトラデカン酸 (ミリスチン酸) (図 1 4 ピーク 1)、及びヘキサデカン酸 (パルミチン酸) (図 1 4 ピーク 2) のメチルエステル、グリセロール由来のピーク (図 1 6 ピーク 1) が検出された。

以上、上記分画にはグリセロ脂質が含有されていることが確認され、グリセロ脂質がアポトーシス誘発活性及びがん細胞増殖抑制活性を有することが明らかとなった。

### 実施例 3

(1) 実施例 1 - (1) 記載のガゴメ昆布由来の抽出液の 40 倍濃縮物 230 ml に水を添加し 910 ml とし、これにエタノール 490 ml を添加し、2 時間かくはん後、遠心分離し、35% エタノール可溶物を調製した。この 35% エ

タノール可溶物を濃縮乾固後、水 100 ml を添加し、次いでクロロホルム：メタノール = 2 : 1 の混合液 400 ml を添加し、充分かくはん後、分離した上層液を回収した。下層の有機溶媒相を留去後、水を加えて 100 ml とし、この操作を 3 回繰り返して得られた上層液を濃縮乾固後、クロロホルム 10 ml を添加し、クロロホルム可溶物を得た。このクロロホルム可溶物を濃縮後、あらかじめクロロホルムで平衡化した 200 ml のイアトロビーズ 6 RS-8060 (ヤトロン社製) カラムにかけ、クロロホルムで溶出し、次いでクロロホルムとアセトンの比が 90 : 10、70 : 30、40 : 60、20 : 80 の混合物で順次溶出させた。

その結果、クロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が 40 : 60 の溶出画分に強いアポトーシス誘発活性を確認した。

(2) クロロホルム溶出画分につき、シリカゲルプレート 60 F<sub>254</sub> (メルク社製) 上にスポットした後、展開溶媒としてヘキサン：エーテル = 9 : 1 を用い、薄層クロマトグラフィーを行ったところ、R<sub>f</sub> 値約 0.25 にアポトーシス誘発活性、がん細胞増殖抑制活性を有する単一スポットが検出された。

このスポットに関して実施例 1 に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図 17、18 に R<sub>f</sub> 値約 0.25 のスポットの脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図 17 は R<sub>f</sub> 値約 0.25 のスポットの脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図 18 は R<sub>f</sub> 値約 0.25 のスポットの糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度 (%)、横軸上部は保持時間 (分)、下部はスキャン番号を示す。

図 17、18 に示すように R<sub>f</sub> 値約 0.25 のスポットからテトラデカン酸 (ミリスチン酸) (図 17 ピーク 1)、ヘキサデカン酸 (パルミチン酸) (図 17 ピーク 2)、及びオクタデセン酸 (オレイン酸) (図 17 ピーク 3) の各々のメチルエステル、及びグリセロール由来のピーク (図 18 ピーク 1) が検出された。

(3) クロロホルムとアセトンの比が 40 : 60 の溶出画分につき、展開溶媒としてクロロホルム : メタノール = 95 : 12 を展開溶媒として用い、薄層クロマトグラフィーを行ったところ、 $R_f$  値約 0.33 にアポトーシス誘発活性、がん細胞増殖抑制活性を有するスポットが検出された。

このスポットに関して実施例 1 に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図 19、20 に  $R_f$  値約 0.33 のスポットの脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図 19 は  $R_f$  値約 0.33 のスポットの脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図 20 は  $R_f$  値約 0.33 のスポットの糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度 (%)、横軸上部は保持時間 (分)、下部はスキャン番号を示す。

図 19、20 に示すように  $R_f$  値約 0.33 のスポットからはテトラデカン酸 (ミリスチン酸) (図 19 ピーク 1)、及びヘキサデカン酸 (パルミチン酸) (図 19 ピーク 2) のメチルエステル、ガラクトース由来のピーク (図 20 ピーク 2、3、4) 及びグリセロール由来のピーク (図 20 ピーク 1) が検出された。

以上、上記実施例 3-(2) 及び実施例 3-(3) 記載のスポットにはグリセロ脂質、グリセロ糖脂質が含有されていることが確認され、グリセロ脂質及びグリセロ糖脂質がアポトーシス誘発活性及びがん細胞増殖抑制活性を有することが明らかとなった。

#### 実施例 4

ガゴメ昆布乾燥物の 1 mm 角破碎品 2.5 kg に 10 倍量の水を添加し、昆布が膨潤した後、上清を遠心除去した。昆布膨潤物に最終 10 倍量の 60% エタノールとなるようにエタノール及び水を添加し、37°C、3 時間かくはん後、遠心分離により上清液を調製した。上清液を濃縮後、その水溶液 750 ml にクロロ

ホルム、メタノールをクロロホルム：メタノール：水 = 2 : 4 : 0. 8 となるように添加し充分かくはん後、下層の有機相液を分離した。

この下層液を濃縮乾固後、クロロホルム可溶物を調製した後、あらかじめクロロホルムで平衡化した 200 ml のイアトロビーズ 6RS-8060 (ヤトロン社製) カラムにかけ、クロロホルムで溶出し、次いでクロロホルムとアセトンの比が 40 : 60 の混合液、アセトン、メタノールで順次溶出させた。

各溶出画分を濃縮後、シリカゲルプレート 60F<sub>254</sub> にスポットし、プリムリン試薬及びオルシノール硫酸試薬を各々用いて糖脂質の検出を行い、両画分の糖脂質の存在を確認した。その結果、極性の低い溶媒で溶出した画分ほど脂質の含量が高く、又アポトーシス誘発作用及びがん細胞増殖抑制作用も強い活性を示した。

### 実施例 5

乾燥ガゴメコンブをミキサーで粉碎した。このコンブ粉末 0.5 g に対して 2.5 ml の① 60 mM HCl、② 1 M 酢酸、③ 1% NaHCO<sub>3</sub>、④ 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、⑤ 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、⑥ クロロホルム：メタノール = 2 : 1、⑦ 75% エタノール水溶液、⑧ 0.1% SDS、又は⑨ 0.01% SDS を加え、①、②、③、④、及び⑦は 60°C で、それ以外は 37°C で 3 時間抽出した。なお、今後①～⑨の溶液を一次抽出液と呼ぶ。①と②は Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で、④と⑤は HCl で中和し、それ以外はそのまま遠心分離した後、以下の操作を行った。

A. 沈殿に 2.5 ml の 75% エタノール水溶液を加えて 60°C で 2 時間抽出し、遠心上清を減圧下濃縮乾固した後 1 ml の 75% エタノール水溶液に溶解する。

B. 10 ml の上清に 30 ml のエタノールを加えて混合し、遠心上清を減圧下濃縮乾固した後 0.4 ml の 75% エタノール水溶液に溶解する。

C. 上清を減圧下乾固し、1 ml の 75% エタノール水溶液に溶解する。

こうして得られた抽出液を 7.5% エタノール水溶液で希釈し、96 穴マイクロタイタープレートのウェルに 5 μl ずつ加えて風乾した後、5000 個の HL-60 細胞を含む 10% 牛胎児血清含有 RPMI 1640 培地 100 μl を加え、後述の実施例 7 に記載の MTT 法によりがん細胞増殖抑制活性を測定した。

その結果、表 1 に示す結果が得られた。すなわち、表 1 は抽出方法とがん細胞増殖抑制活性の関係を示す表であり、表 1 中の数字はがん細胞増殖抑制活性を有していた希釈液の希釈倍率を示す。7.5% エタノール水溶液で抽出する前に酸性（①A.）又はアルカリ性（③A.、④A.、⑤A.）の一次抽出液で粉末コンブを処理することによって無処理区（⑦C.）に比べて 2 倍のがん細胞増殖抑制活性物質が抽出された。またこれらの画分について後述の実施例 8 記載の方法によりアポトーシス誘発活性を測定し、がん細胞増殖抑制活性画分のアポトーシス誘発作用を確認した。

表 1

一次抽出液	A.	B.	C.
①	8	< 2	
②	4	4	
③	8	—	
④	8	4	
⑤	8	2	
⑥			8
⑦			4
⑧		2	
⑨		< 2	

## 実施例 6

(1) 特公平6-34660号公報記載の方法に従って、リオフィラム ウルマリウム (*Lyophyllum ulmarium*) M-8171 (FERM BP-1415) を栽培し、リオフィラム ウルマリウム (和名ブナシメジ) 子実体を調製した。なおこの子実体は「やまびこほんしめじ」として市販されている子実体と同一物である。また特開昭3-65261号公報記載の方法に従ってリオフィラム デカステス (*Lyophyllum decastes*) K-3304 (FERM BP-4348) を栽培し、リオフィラム デカステス (和名ハタケシメジ) 子実体を調製した。これらの子実体と、市販のマイタケ、エノキタケ、シイタケ、ナメコをそれぞれ凍結乾燥し、凍結乾燥物を調製し、その粉碎物を調製した。

上記きのこの粉碎物各0.5gに75%エタノール水溶液を25ml添加し、室温で2時間抽出した。遠心分離により、抽出液を得た後、該抽出液を減圧下濃縮乾固し、乾燥物を調製した。この乾燥物を水1mlに溶解し、エタノール抽出液を調製した。

(2) 上記実施例6-(1)記載のエタノール抽出液のがん細胞増殖抑制活性を測定した。

エタノール抽出液をそれぞれG D/X P E S フィルター (ワットマン社製) でろ過滅菌し、滅菌水で希釈系列を作製した。各希釈液10μlを96穴マイクロタイヤープレートのウェルに入れ、そこに5000個のHL-60細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地100μlを加え、5%炭酸ガス存在下、37°Cで48時間培養した。細胞の形態を光学顕微鏡で観察した後、5mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT; シグマ社製) リン酸緩衝食塩水溶液10μlを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロピルアルコール100μlを加えてよくかくはんし、590nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした。

きのこのエタノール抽出液のがん細胞増殖抑制活性に関しては、ブナシメジの

30倍希釈液と、ハタケシメジの10倍希釈液で細胞は死滅し、強いがん細胞増殖抑制活性が認められ、アポトーシス小体が見られた。またマイタケ、エノキタケ、シイタケ、ナメコの3倍希釈液で細胞は死滅しており、10倍希釈液においてアポトーシス小体が見られ、各きのこのエタノール抽出液は強いがん細胞増殖抑制活性とアポトーシス誘発作用を有していた。

(3) 実施例6－(1) 記載のブナシメジのエタノール抽出液に関して実施例1に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図21、22にブナシメジのエタノール抽出液中の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図21はブナシメジのエタノール抽出液中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図22はブナシメジのエタノール抽出液中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度(%)、横軸上部は保持時間(分)、下部はスキャン番号を示す。

図21、22に示すようにブナシメジのエタノール抽出液中にはヘキサデカン酸(パルミチン酸)(図21ピーク1)、及びシス-9,シス-12-オクタデカジエン酸(リノール酸)(図21ピーク2)のメチルエステル、グルコース由来のピーク(図22ピーク2、3、4、)、マンニトール由来のピーク(図22ピーク5)及びグリセロール由来のピーク(図22ピーク1)が検出された。

また他のきのこのエタノール抽出物に関してもグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の存在を確認した。

### 実施例7

実施例6記載のブナシメジの凍結乾燥粉碎物5gを250mlの75%エタノール水溶液に懸濁し、室温で2時間振とうした後、遠心分離で上清と沈殿に分離

し、抽出液を得た。この抽出液を、ロータリーエバポレーター（30°C）で濃縮乾固し、20mlの75%エタノール水溶液に再溶解して、ブナシメジ抽出濃縮物を得た。このブナシメジ抽出濃縮物の一部に1/2体積の水、ブナシメジ抽出濃縮物と等量のクロロホルムを添加し懸濁した後に、静置して上層と下層に分画した。分画した上層、下層それぞれを濃縮乾固した後、分画に用いたブナシメジ抽出濃縮物の1/2量の75%エタノール水溶液に再溶解して、それぞれの画分のがん細胞増殖抑制活性を以下のように測定した。

それぞれの画分の75%エタノール水溶液再溶解物の希釈系列を75%エタノール水溶液で作製した。各希釈液5μlを96穴マイクロタイヤープレートに入れ、乾燥させた後、そこに5000個のHL-60細胞（ATCC CCL-240）を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地100μlを加え、5%炭酸ガス存在下、37°Cで48時間培養した。細胞の形態を光学顕微鏡で観察した後、5mg/mlのMTTリン酸緩衝食塩水溶液10μlを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HCl含有2-プロピルアルコール100μlを加えてよくかくはんし、590nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした（MTT法）。

その結果、下層からの上記画分の20倍希釈液で細胞は死滅し、強いがん細胞増殖抑制活性が認められ、アポトーシス小体が確認された。そこで、このブナシメジ抽出濃縮物を同様の操作で、クロロホルム分画を行い、75%エタノール水溶液ではなく、シリカゲルカラムクロマト用の移動相に再溶解した後、シリカゲルカラムクロマトを行った。シリカゲルカラムクロマトは、移動相として、クロロホルム：メタノール：水=65：25：4（条件1）、クロロホルム：メタノール=65：25（条件2）の2条件でそれぞれ独立して行った。それぞれのシリカゲルカラムクロマトのフラクションを濃縮乾固し、最初の液量の1/20量の75%エタノール水溶液に再溶解して、前述と同様のMTT法でがん細胞増殖抑制活性を測定し、活性が確認された画分をTLC（クロロホルム：メタノール：水=65：25：4）で分析した。その結果、条件1では、ブリムリン試薬に反応するスポット（脂質）、ニンヒドリン試薬に反応するスポット（アミノ基）

、オルシノール硫酸に反応するスポット（糖）、ディットマー試薬に反応するスポット（リン脂質）が存在するA画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するB画分に活性が存在した。条件2では、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するC画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するD画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、ニンヒドリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するE画分に活性が存在した。更に、条件1のA画分を集めて濃縮乾固後、移動相に溶解してシリカゲルカラムクロマトを行った。移動相として、クロロホルム：メタノール=95:5（条件3）を用いた。前回と同様に各フラクションをMTT法でアッセイし、活性が確認された画分をTLC（クロロホルム：メタノール=9:5:5）で分析した。その結果、条件3においては、プリムリン試薬に反応するスポットが存在するF画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するG画分と、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するH画分に活性が存在した。これらのがん細胞増殖抑制活性区分のアポトーシス誘発活性をアポトーシス小体の形成により確認した。

#### 実施例8

実施例6記載のブナシメジの凍結乾燥粉碎物1gを50mlの75%エタノール水溶液、及び50%エタノール水溶液に懸濁し、37℃で2時間振とうした後、遠心分離で上清と沈殿に分離し、各々の抽出液を得た。これらの抽出液をロータリーエバボレーター（30℃）で濃縮乾固し、各々、8mlの75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液に再溶解してブナシメジ抽出濃縮物を得た。

これらのブナシメジ抽出濃縮物を75%エタノール水溶液、又は50%エタノール水溶液で希釈した。これらの各希釈液を用い、実施例7記載のMTT法でアッセイした。75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液抽出物の10倍希釈液添加区分で細胞死が認められ、がん細胞増殖抑制活性が確認され、75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液両抽出条件において、がん細胞増殖

抑制活性物質が抽出されていることが確認された。更に、これらのブナシメジ抽出濃縮物を用いてアポトーシス誘発活性を測定した。すなわち、上記抽出濃縮液 $25\mu l$ を試料とし、エタノールを揮発せしめた後に、牛胎児血清10%を含有するRPMI 1640培地にて培養したHL-60細胞 $2.5 \times 10^5$ 個/ $4.5ml$ に添加し、37°C、48時間培養した。同時に对照試料として、蒸留水及びアポトーシス誘発活性を有することが判っているアクチノマイシンD溶液( $10\mu g/ml$ )を添加した。光学顕微鏡下でアポトーシス小体の形成、細胞の収縮、核の凝縮を肉眼観察し、生細胞数をカウントした。これらの現象が観察され、生細胞数の減少が認められるものをアポトーシス誘発活性有りと判断した。その結果、75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液抽出物にアポトーシス誘発物質が存在することが確認された。

#### 実施例9

(1) 市販のヒラタケとマッシュルーム各々の凍結乾燥粉末 $0.5g$ に $25ml$ の75%エタノール水溶液を加え、37°Cで2時間抽出した。遠心上清を減圧下濃縮乾固し、 $1ml$ の75%エタノール水溶液に溶解した後、75%エタノール水溶液で希釈した。希釈液 $1\mu l$ に $5000$ 個のHL-60細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地 $100\mu l$ を添加し、実施例7に記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、ヒラタケの2倍希釈液とマッシュルームの非希釈液に両活性が見られた。

(2) 40gの実施例6記載のブナシメジに0(0%)、50(25%)、100(50%)、又は $150ml$ (75%)のエタノールと160、110、60、又は $10ml$ の水を加えてミキサーで30秒間ホモジナイズし、室温で2時間振とうした後、ろ過によって抽出液を得た。この抽出液を75%エタノール水溶液で希釈し、実施例7に記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、0、25、50%エタノ

ール水溶液抽出物の2倍希釈液と75%エタノール水溶液抽出物の5倍希釈液に両活性が見られた。

前記ブナシメジを3~5mm角に裁断したもの40gに50(25%)、100(50%)、又は150ml(75%)のエタノールと110、60、又は10mlの水を加え、室温で2時間振とうした後、ろ過によって抽出液を得た。この抽出液を75%エタノール水溶液で希釈し、実施例7記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、25%エタノール抽出物の原液(非希釈)と50%及び75%エタノール水溶液抽出物の2倍希釈液に両活性が見られた。

(3) 市販のシイタケを凍結乾燥して粉碎した粉末を表2に示す条件で2時間抽出した。

表 2

	シイタケ 粉末(g)	エタノール 濃度(%)	抽出液量(ml)	抽出温度 (°C)
①	0.5	25	20	60
②	0.5	75	10	室温
③	0.5	50	10	室温
④	0.5	75	25	室温

抽出後遠心によって不溶物を除き、上清を減圧下濃縮乾固した後抽出液と同じ濃度のエタノール水溶液1mlに溶解した。この液を75%エタノール水溶液で希釈し、実施例7記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定したところ、①の10倍希釈液、②の2倍希釈液

、③の5倍希釈液、及び④の5倍希釈液に両活性が見られた。

(4) 市販のシイタケを傘と軸に分け、別々に凍結乾燥したのち粉碎し、その粉末0.5gに25mlの75%エタノール水溶液を加えて37℃で2時間抽出した。遠心上清を減圧下濃縮乾固し、1mlの75%エタノール水溶液に溶解した後、75%エタノール水溶液で希釈した。この希釈液のがん細胞増殖抑制活性を実施例7記載のMTT法、アポトーシス誘発活性を実施例8記載の方法で測定したところ、傘抽出液の2倍希釈液と軸抽出液の20倍希釈液に両活性が見られた。中国産干しシイタケの上級品と、中級品の傘と軸についてもミキサーで粉碎して同様の抽出とアポトーシス誘発活性の測定を行ったところ、上級品抽出液、中級品傘抽出液、及び中級品軸抽出液の各々5倍希釈液に両活性が見られた。

#### 実施例10

(1) 市販の抹茶0.5gに水又は75%エタノール水溶液25mlを加え、室温で2時間振とうした。抽出物を遠心分離した後、上清を減圧下濃縮乾固し、1mlの水に溶解した。

この抽出液を1倍から100倍まで希釈し、希釈液10μlと5000個のHL-60細胞を含む10%ウシ胎児血清含有RPMI1640培地100μlを96穴マイクロタイプレートのウェルに添加して48時間培養し、光学顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。その結果、水抽出物、75%エタノール抽出物共にすべての希釈段階添加区分で細胞は死滅しており、茶の水抽出物、エタノール抽出物は強いがん細胞増殖抑制活性を有していた。またアポトーシス小体の形成によりアポトーシス誘発作用を確認した。

(2) 実施例10-(1)記載の抹茶のエタノール抽出液に関して実施例1に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図23、24に抹茶のエタノール抽出液中の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図23は抹茶のエタノール抽出液中の脂質成分の

全イオンクロマトグラムを示す図であり、図24は、抹茶のエタノール抽出液中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度(%)、横軸上部は保持時間(分)、下部はスキャン番号を示す。

図23、24に示すように抹茶のエタノール抽出液中にはヘキサデカン酸(パルミチン酸)(図23ピーク1)及び9,12,15-オクタデカトリエン酸(リノレン酸)(図23ピーク2)のメチルエステル、グルコース由来のピーク(図24ピーク3、4)及びグリセロール由来のピーク(図24ピーク1)が検出されグリセロ脂質及び/又はグリセロ糖脂質の存在を確認した。またミオイノシトール由来のピーク(図24ピーク5)、キナ酸由来のピーク(図24ピーク2)も検出された。

### 実施例11

(1) 米糠0.5gに水、7.5%エタノール水溶液又は90%エタノール水溶液を加え、室温で2時間振とうした。抽出物を遠心分離した後、上清を減圧下濃縮乾固し、1mlの水に溶解した。90%エタノール水溶液抽出物に関しては水不溶物をエタノールに溶解した。これらの試料を希釀して実施例7記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定したところ、水抽出物は5倍希釀液、75%エタノール抽出物は非希釀液、90%エタノール抽出物はエタノール可溶画分の10倍希釀液に両活性が見られ、米糠のエタノール抽出物は強いがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発作用を有していた。

(2) 実施例11-(1)記載の75%エタノール抽出物に関して実施例1に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図25、26に米糠の75%エタノール抽出物中の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図25は米糠の75%エタノール抽出物中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図26は、米糠の75%

エタノール抽出物中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度（%）、横軸上部は保持時間（分）、下部はスキャン番号を示す。

図25、26に示すように米糠の75%エタノール抽出物中にはヘキサデカン酸（パルミチン酸）（図25ピーク1）及びオクタデセン酸（オレイン酸）（図25ピーク3）、シス-9,シス-12-オクタデカジエン酸（リノール酸）（図25ピーク2）のメチルエステル、グルコース由来のピーク（図26ピーク2、3）及びグリセロール由来のピーク（図26ピーク1）が検出されグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の存在を確認した。

### 実施例13

ほうれん草由来モノガラクトシルジグリセリド（和光純薬社製）、小麦由来モノガラクトシルジグリセリド（フナコシ社製）、小麦由来ジガラクトシルジグリセリドを微量のn-デカンに懸濁し、超音波処理により更に分散させ、ここにn-デカン：エタノール=2：98の割合となるようエタノールを加えた。この溶液をRPMI 1640培地で50倍に希釀し、更にその0.5mlを、牛胎児血清10%を含有するRPMI 1640にて培養したHL-60細胞 $2.5 \times 10^5$ 個を含有する培養液4.5mlに加え、37°C、48時間培養し、それぞれのアポトーシス誘発作用を実施例1-（4）記載の方法により測定し、強いアポトーシス誘発作用とがん細胞増殖抑制活性を確認した。

### 実施例14

市販のキャベツ、ナスの皮、ナスの皮を除いた部分、及びホウレンソウの葉を凍結乾燥した後粉碎し、実施例9-（4）と同様の方法で抽出を行い、実施例7記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性の測定を行ったところ、キャベツ抽出液、ナスの皮抽出液、及びホウレンソウの葉抽出液の2倍希釀液とナスの皮を除いた部分抽出液の5倍希釀液に両活

性が見られた。

### 発明の効果

本発明により、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来の強いアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とするアポトーシス誘発剤が提供され、そのアポトーシス誘発作用による制がん剤も提供される。このグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は植物、微生物又は動物の膜成分中に多量に存在し、含水エタノール抽出等により効率よく抽出され、簡便に本発明の有効成分を得ることができる。溶媒抽出の前に、酸又はアルカリ処理を行うことにより、抽出効率を向上させることができある。またその疎水性の度合いにより、抽出溶媒の極性の選択、分離用クロマト担体の選択等ができる、目的のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を選択的に製造することができる。特に食用植物、微生物又は動物から抽出及び／又は精製した本発明のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は、日常的に摂取することにより健康が増進し、健康食品として極めて有用なものである。

## 請求の範囲

1. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とすることを特徴とするアポトーシス誘発剤。
2. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とすることを特徴とする制がん剤。
3. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲 1 又は 2 記載の剤。
4. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が茶類、キノコ類、藻類又は穀類カス由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求項 3 記載の剤。
5. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 3 記載の剤の製造方法。
6. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を、酸又はアルカリで処理する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 5 記載の剤の製造方法。
7. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー又は順相クロマトグラフィーから選択された方法により分離する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 5 に記載の剤の製造方法。
8. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が茶類、キノコ類、藻類又は穀類カス由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲 5～7 いずれか 1 項に記載の剤の製造方法。
9. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなるアポトーシス誘発用食品又は飲料。
10. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなる制がん用食品又は飲料。
11. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲 9 又は 10 に記載の食品

又は飲料。

12. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が茶類、キノコ類、藻類又は穀類カス由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲 1 1 記載の食品又は飲料。

13. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 1 1 記載の食品又は飲料の製造方法。

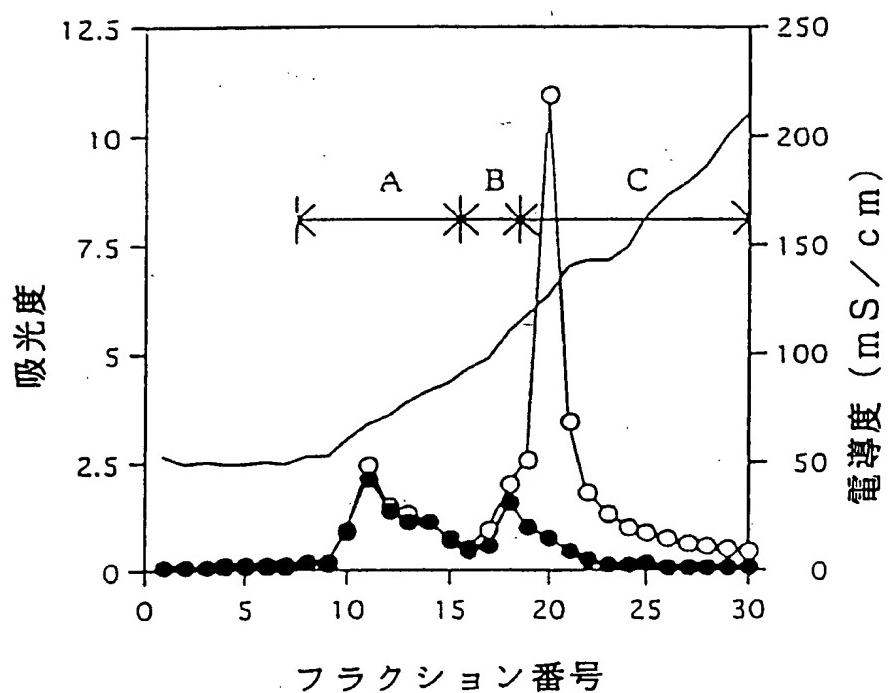
14. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を、酸又はアルカリで処理する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 1 3 記載の食品又は飲料の製造方法。

15. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー又は順相クロマトグラフィーから選択された方法により分離する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 1 3 に記載の食品又は飲料の製造方法。

16. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が茶類、キノコ類、藻類又は穀類カス由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲 1 3 ～ 1 5 いずれか 1 項に記載の食品又は飲料の製造方法。

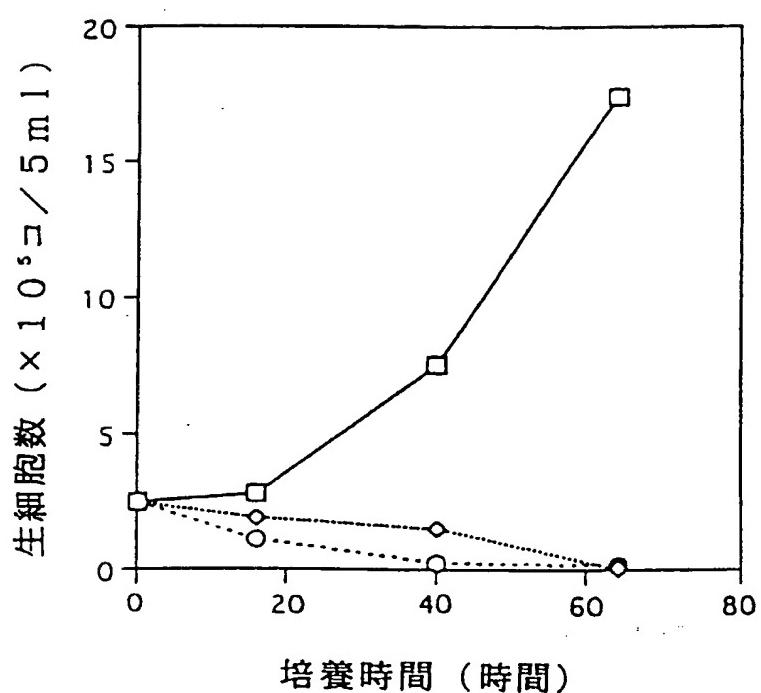
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 1



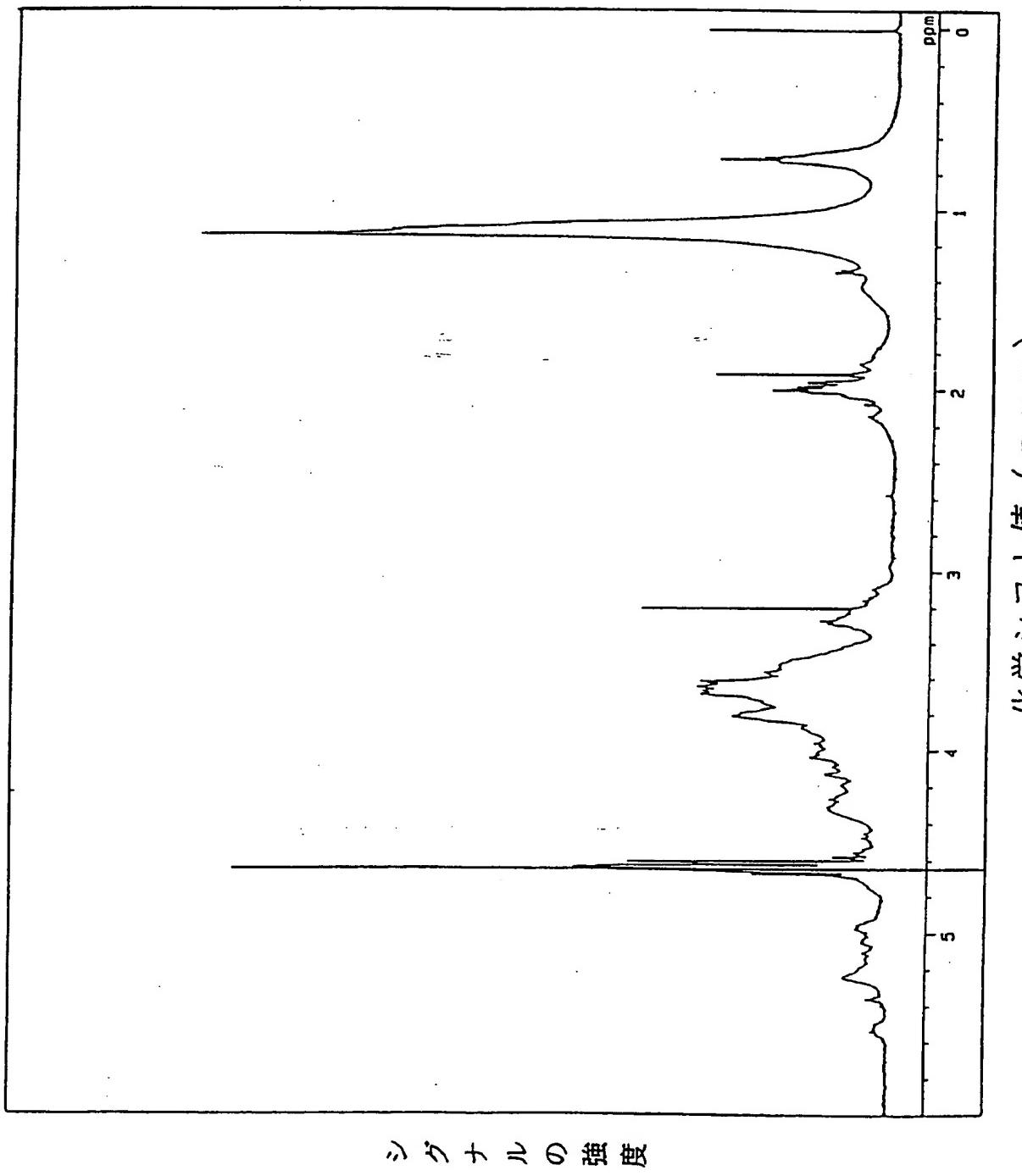
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図2



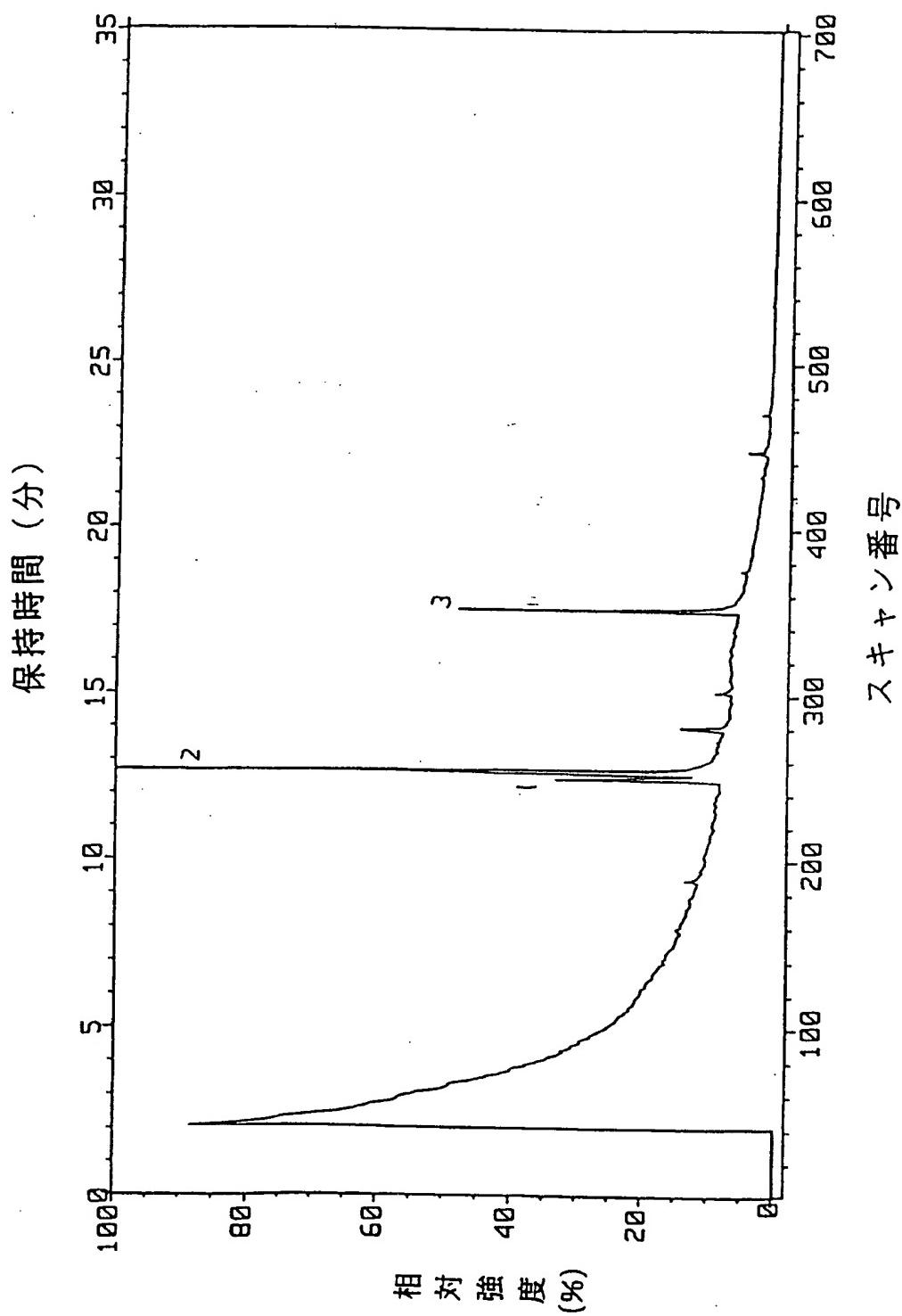
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 3



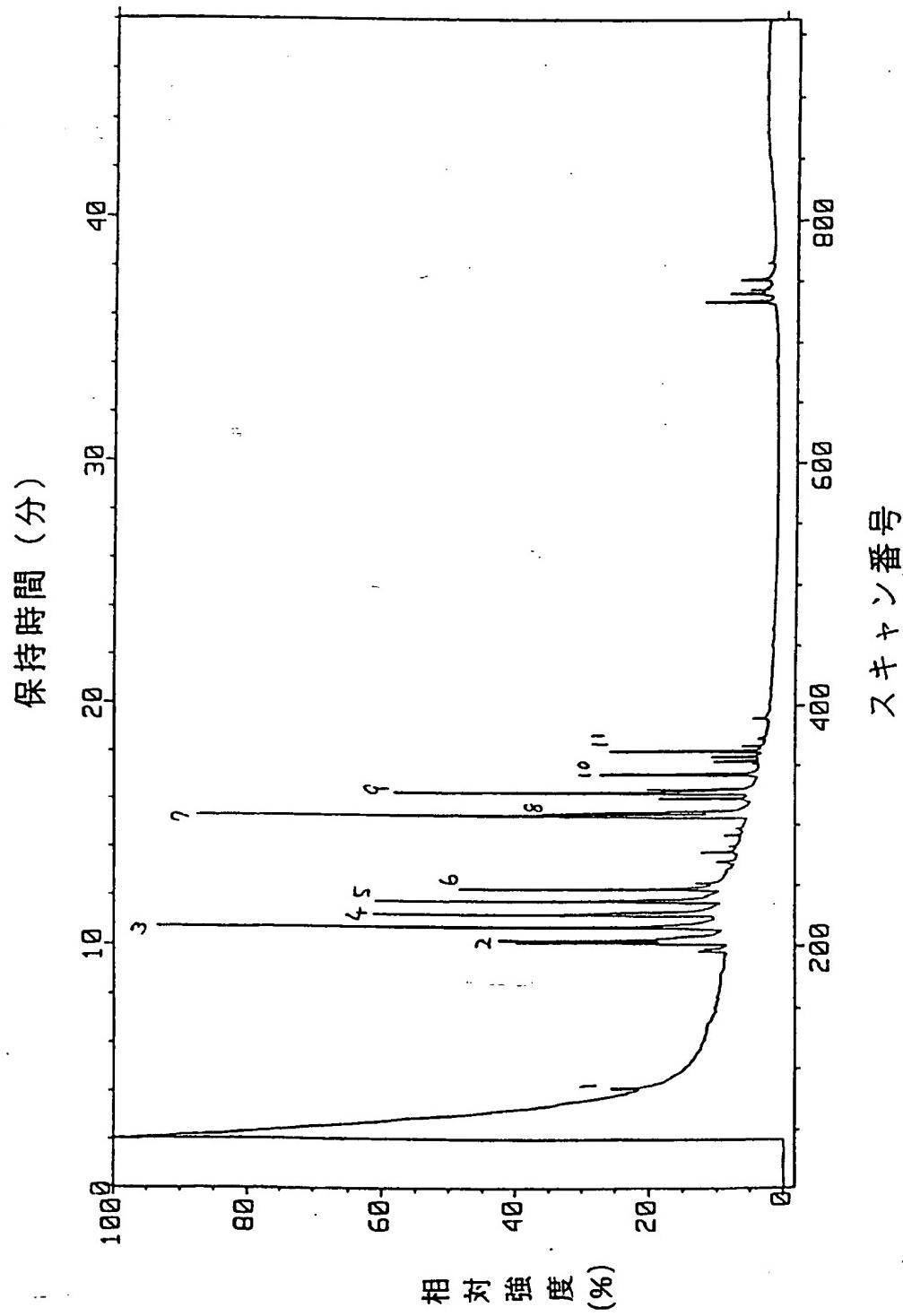
*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

図 4



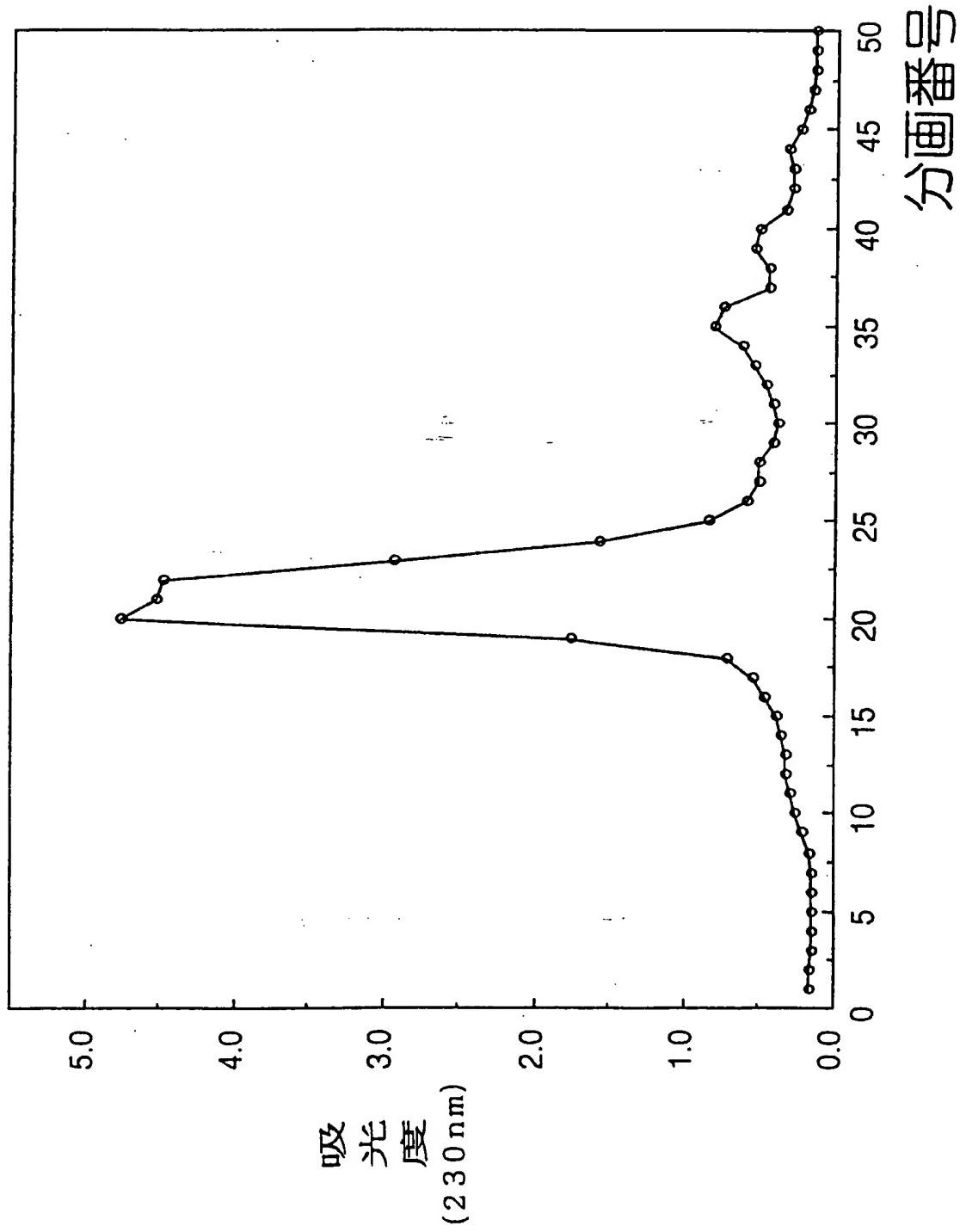
*THIS PAGE BLANK (uspto)*

図 5



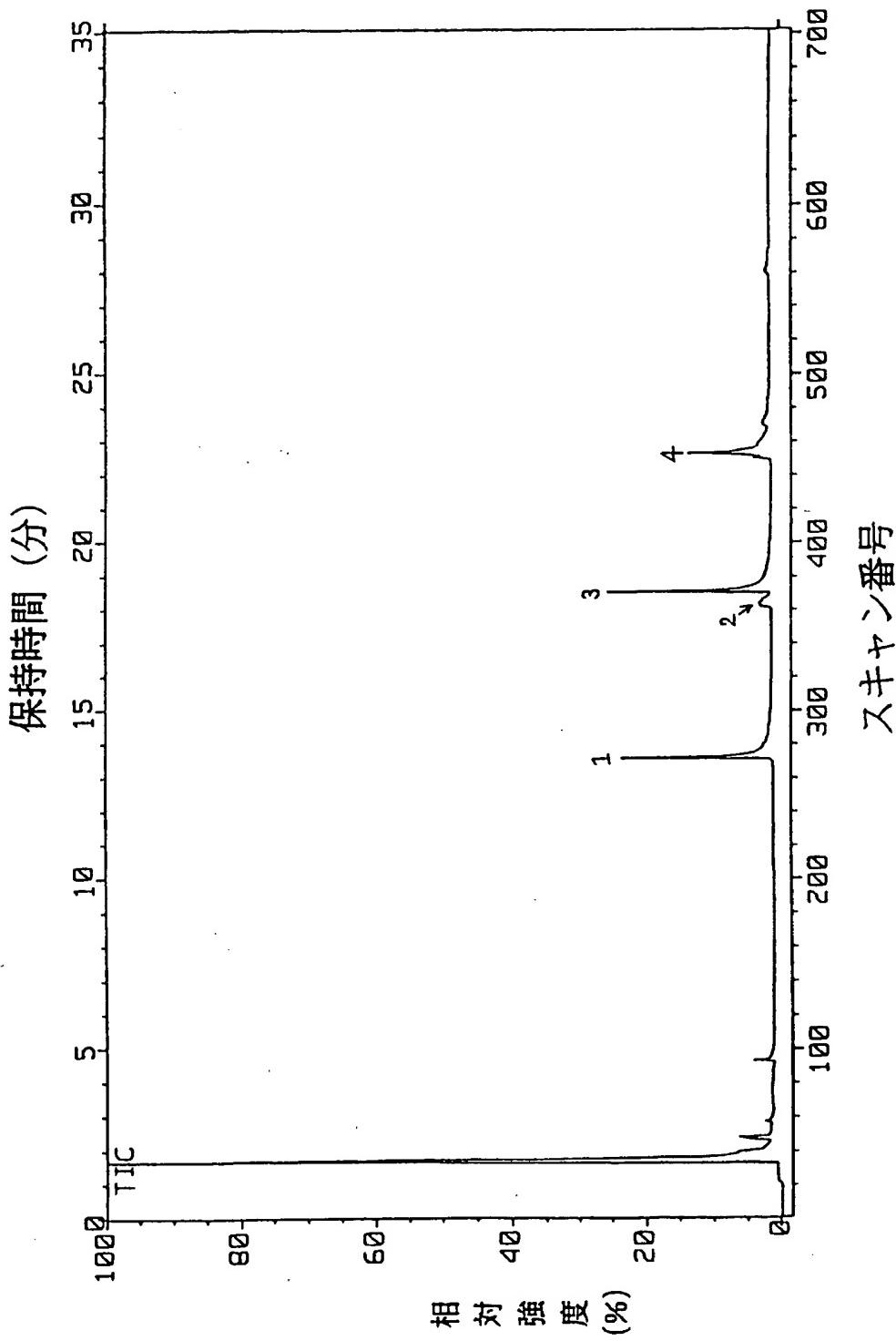
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 6



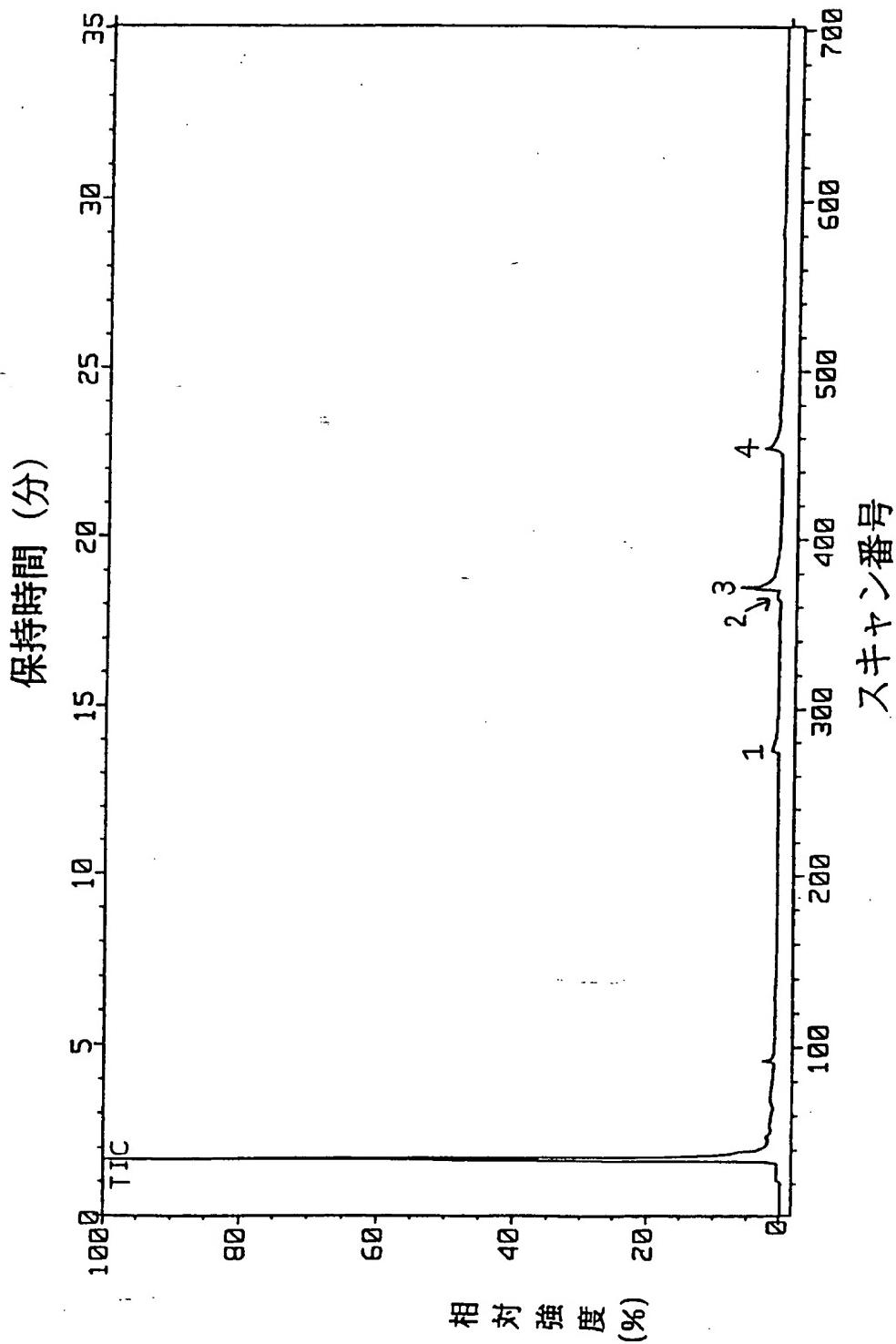
*THIS PAGE BLANK (uspto)*

図 7



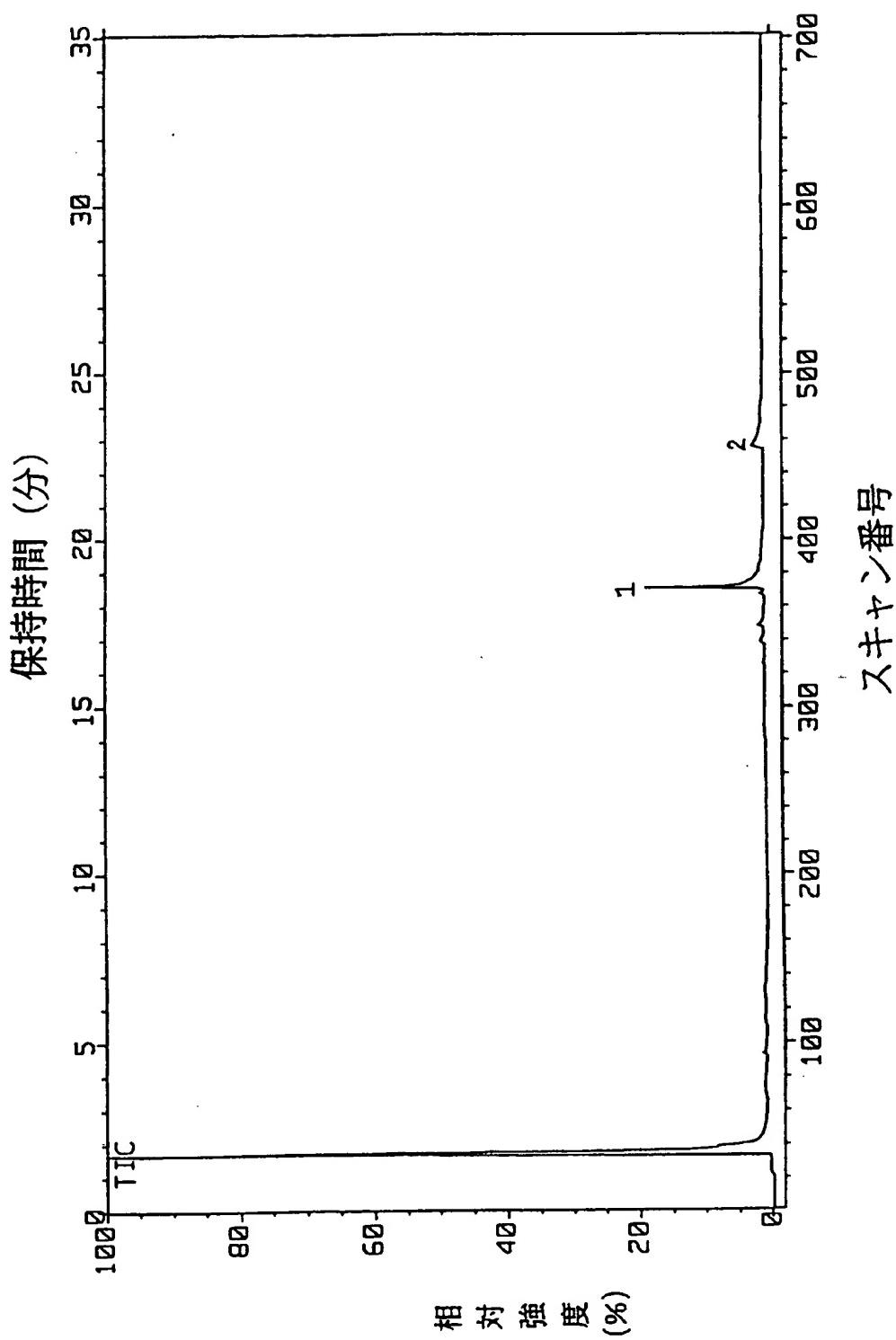
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図8



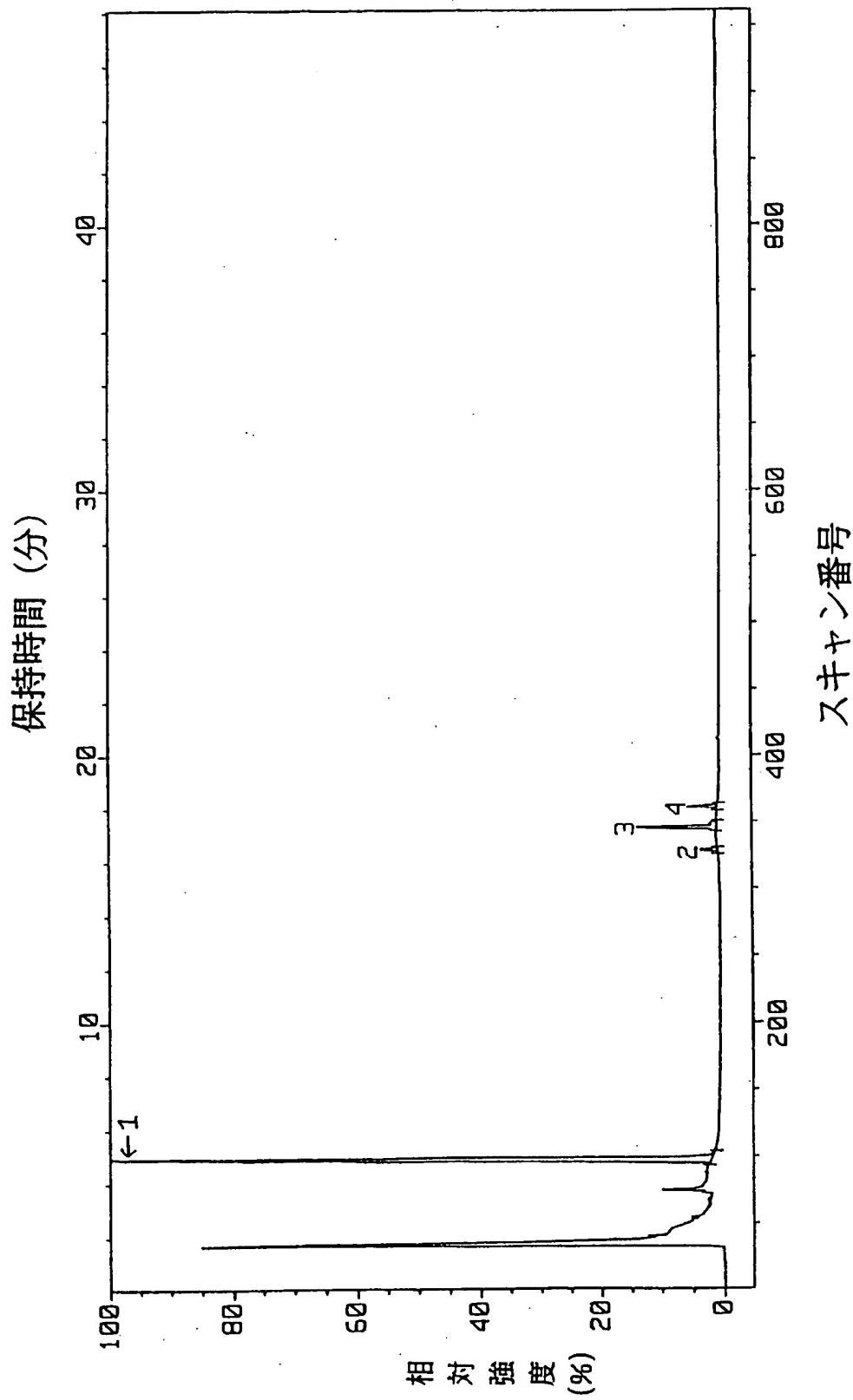
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 9



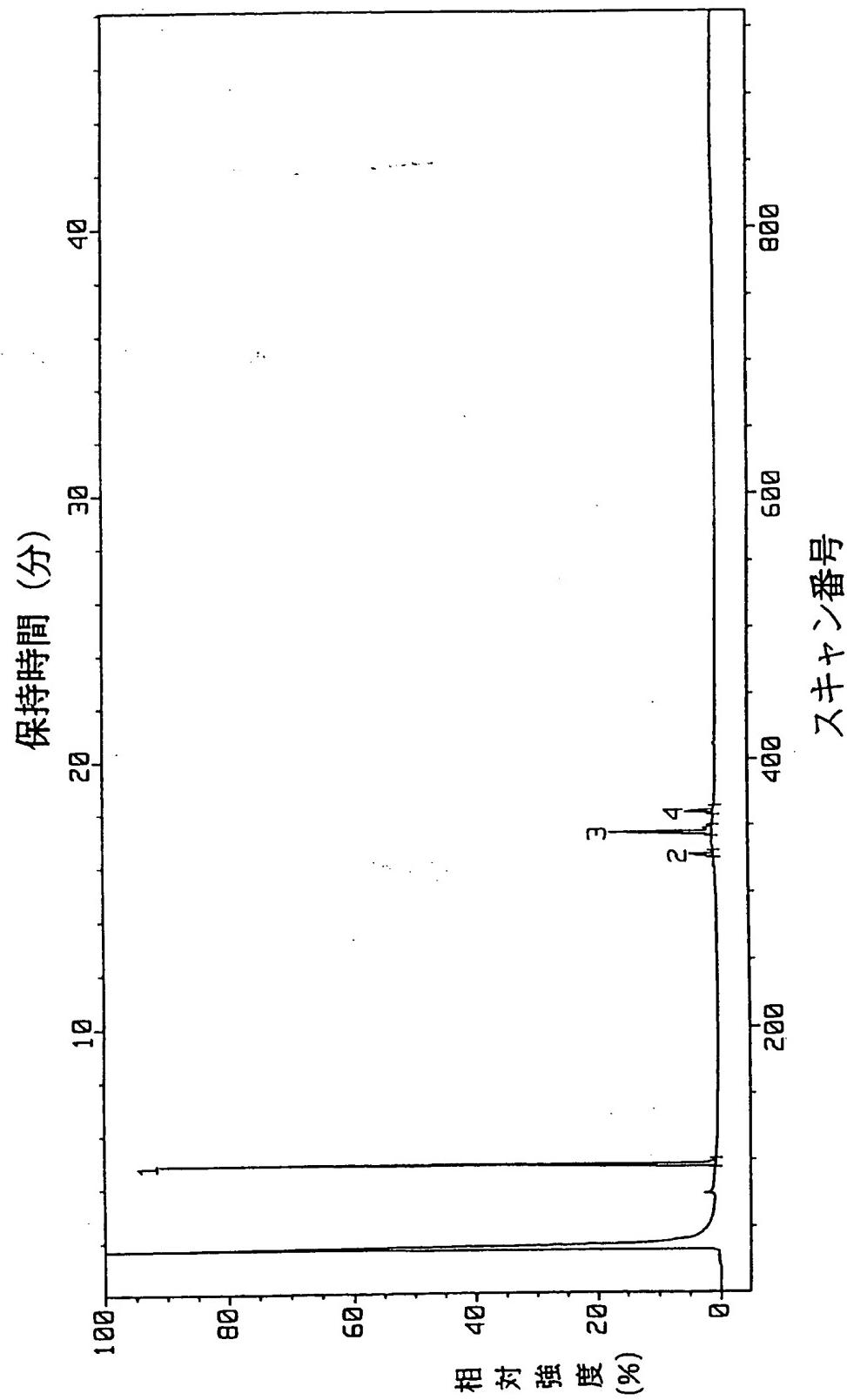
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 10



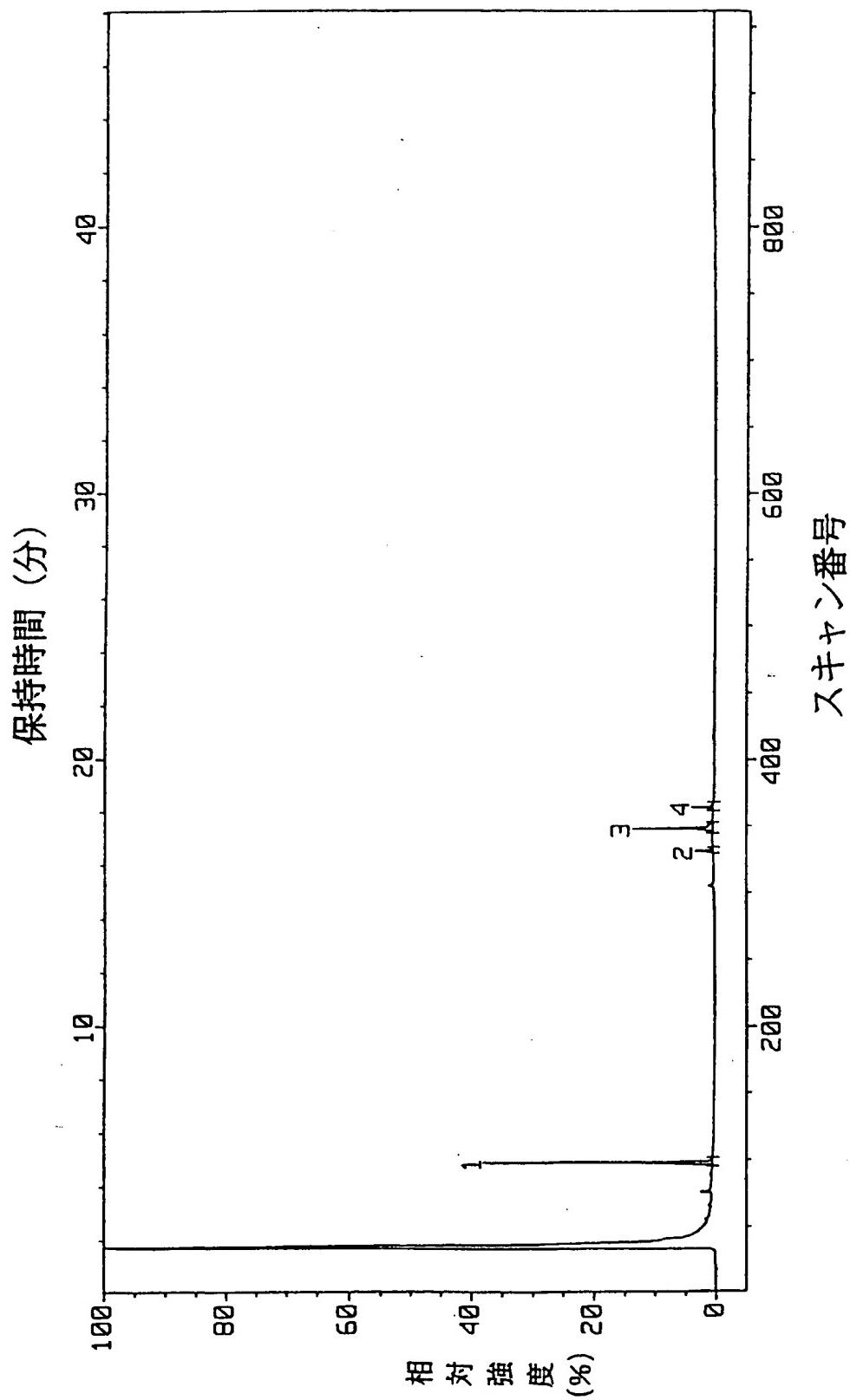
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 1 1



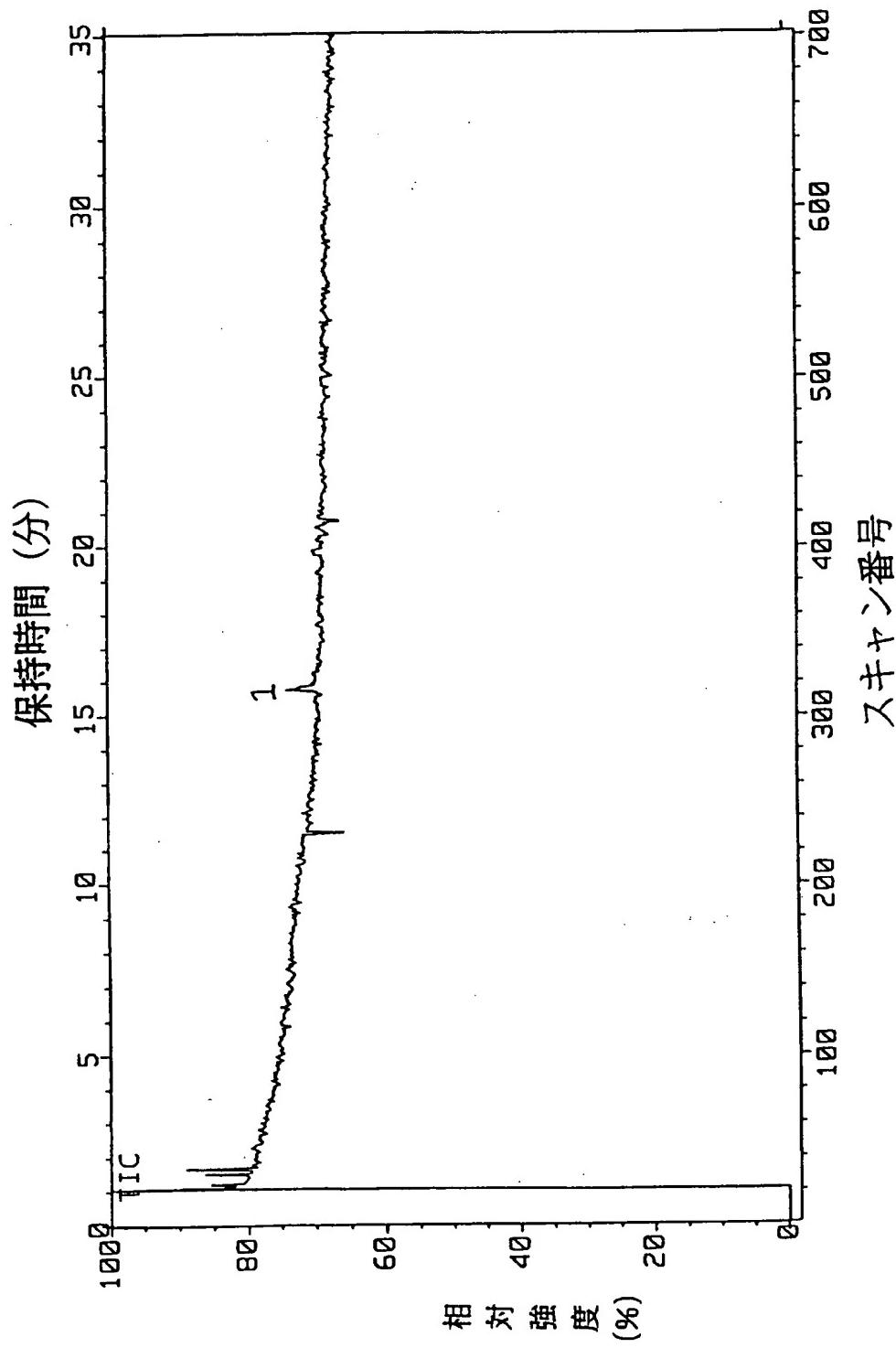
**THIS PAGE BLANK (USPS)**

図 12



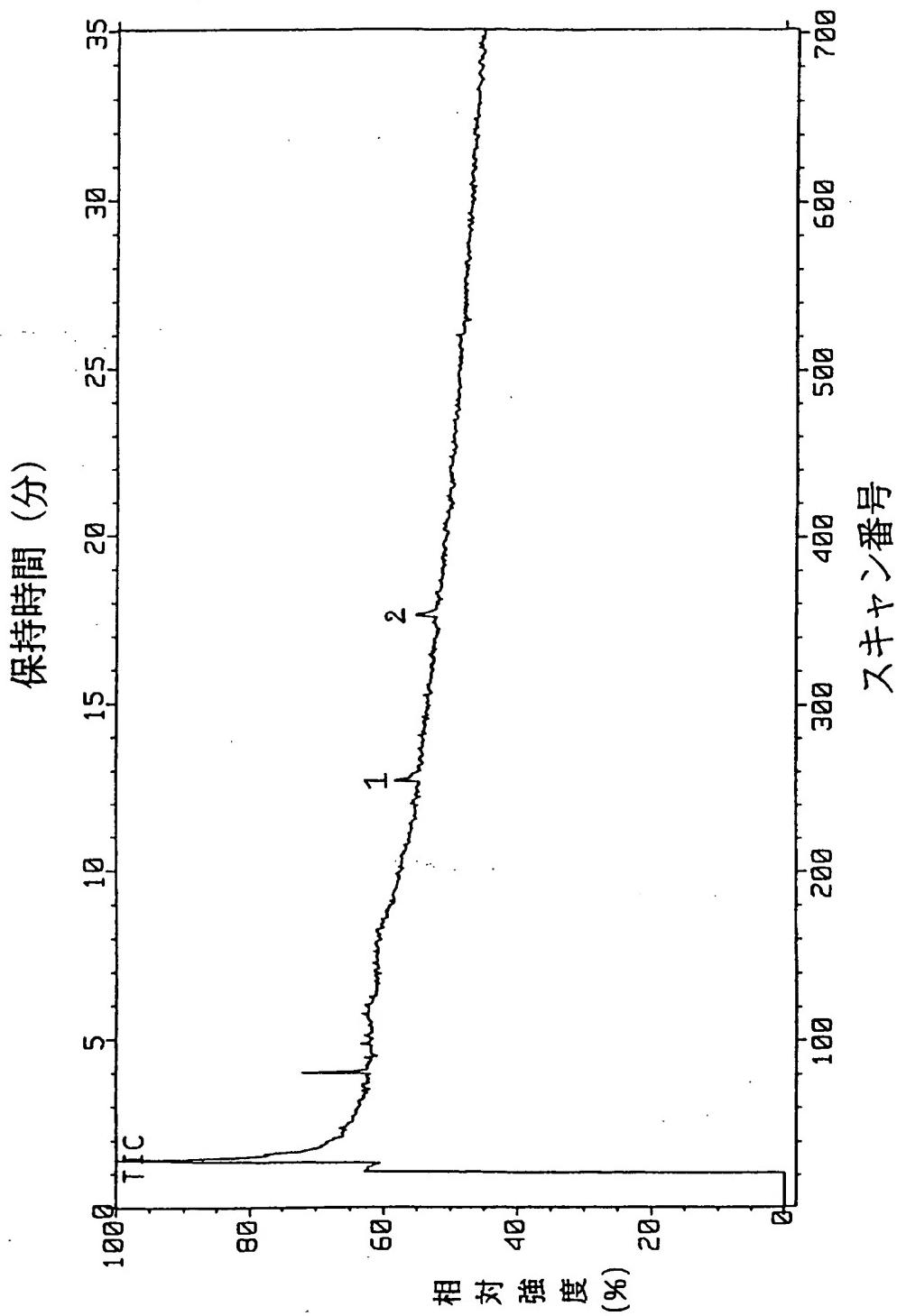
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 1 3



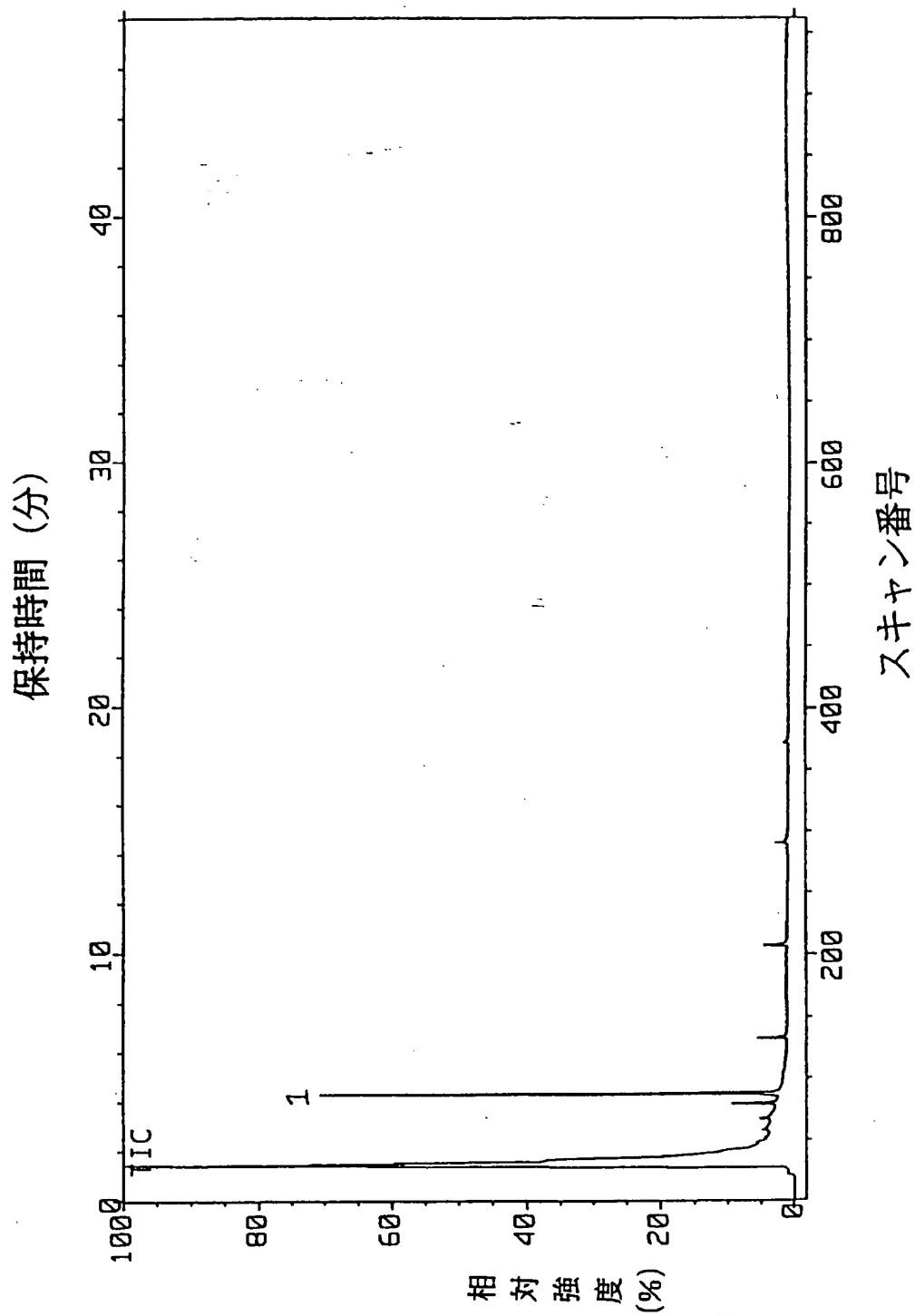
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 1 4



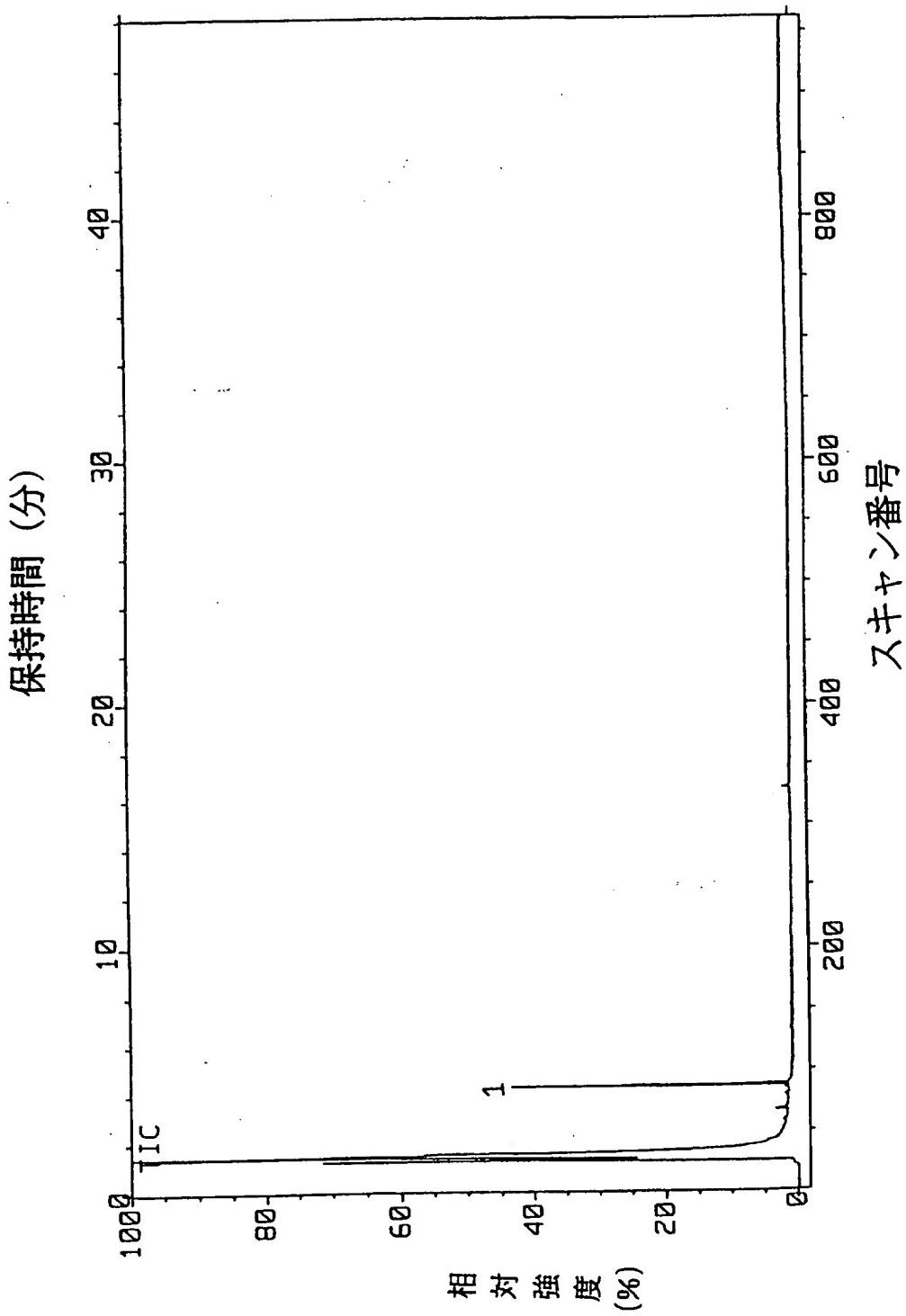
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 15



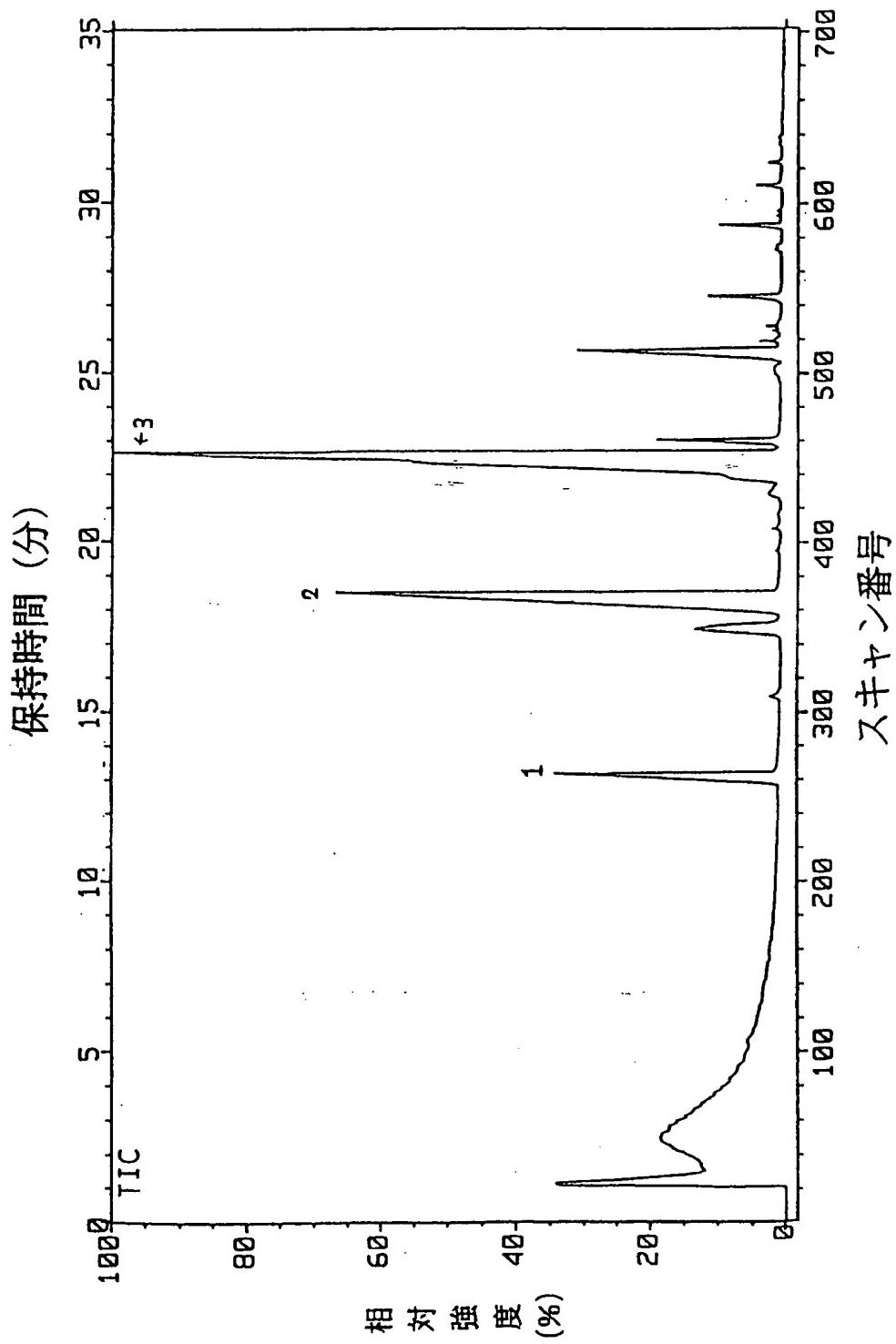
*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

図 16



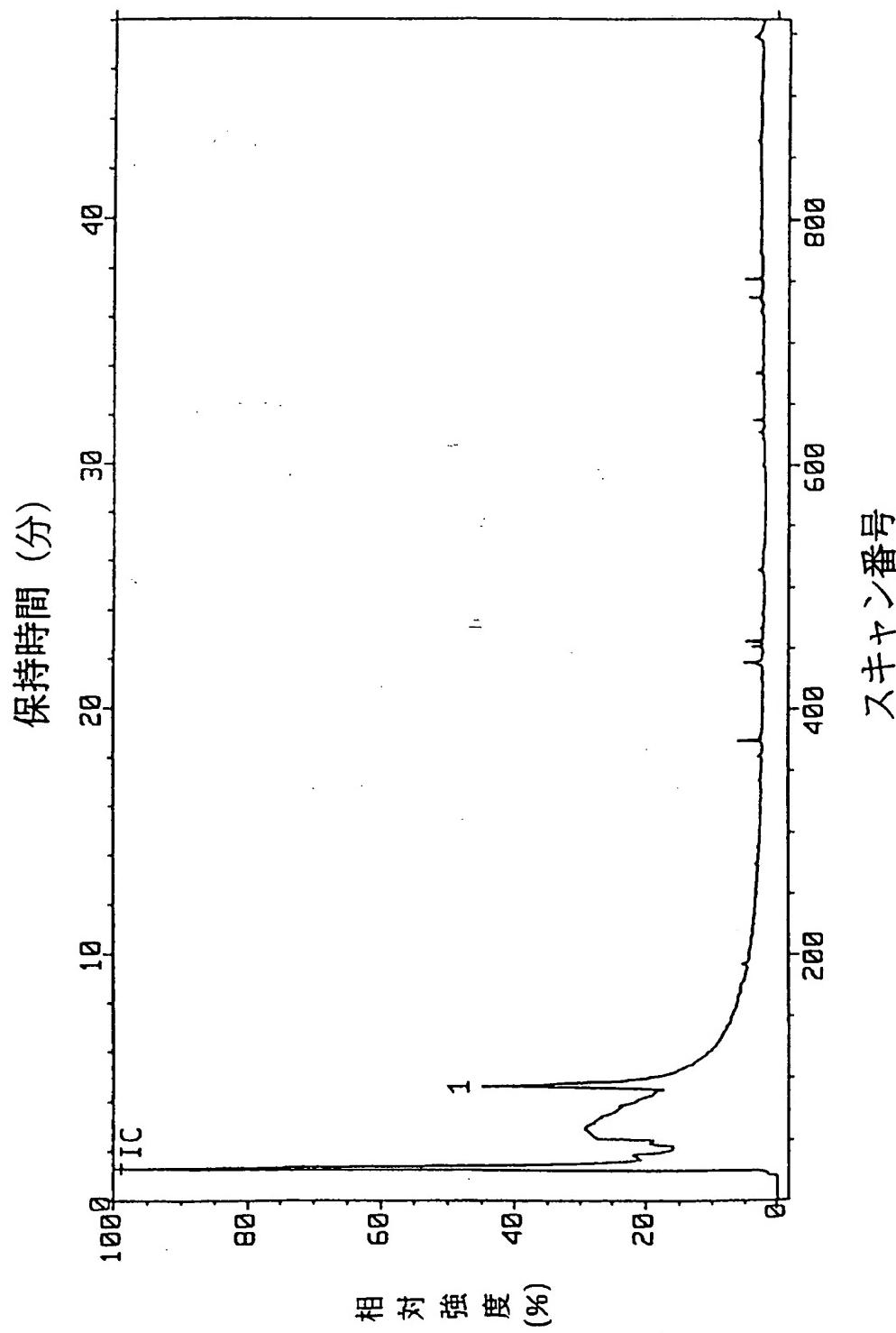
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 17



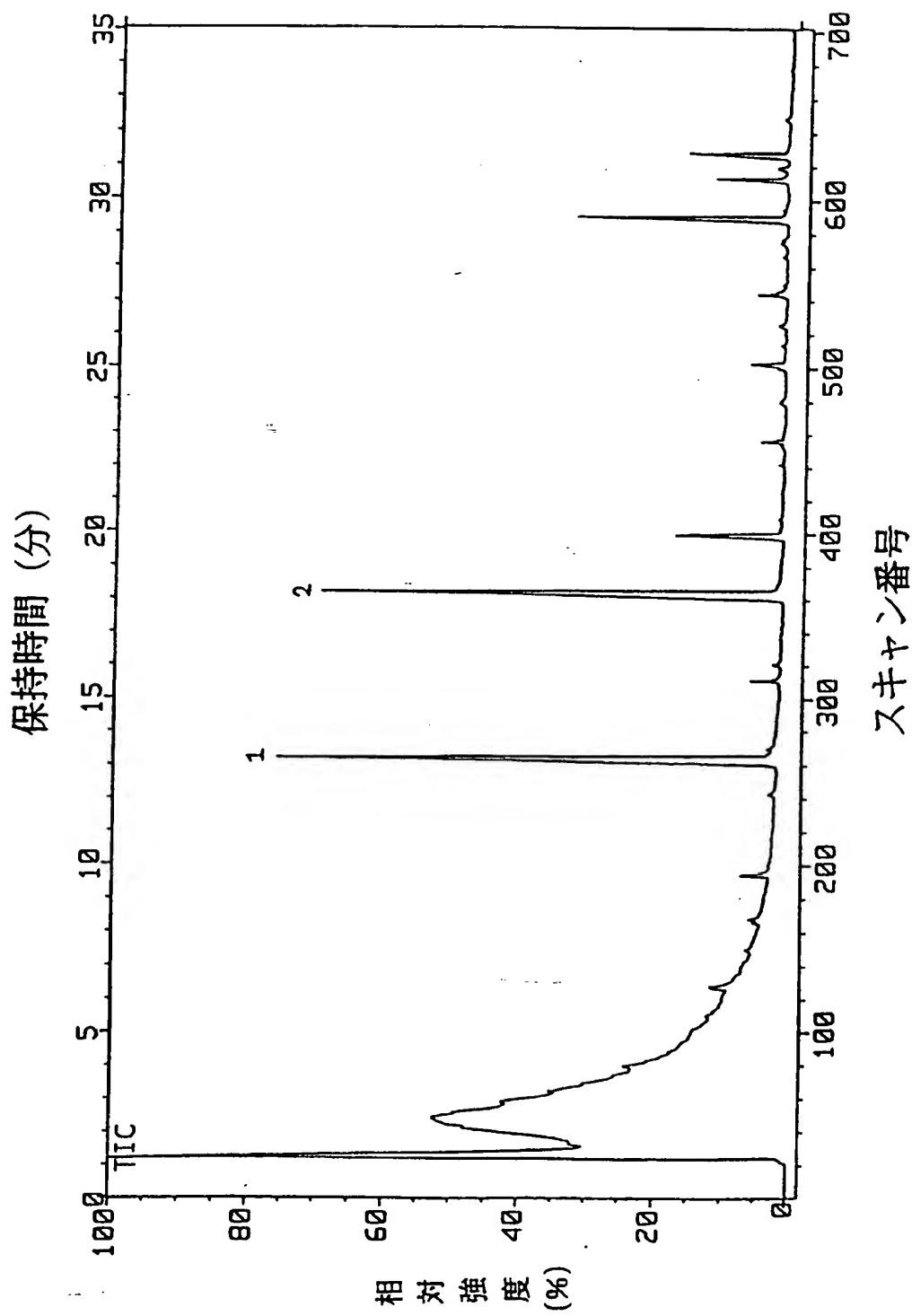
*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

図 18



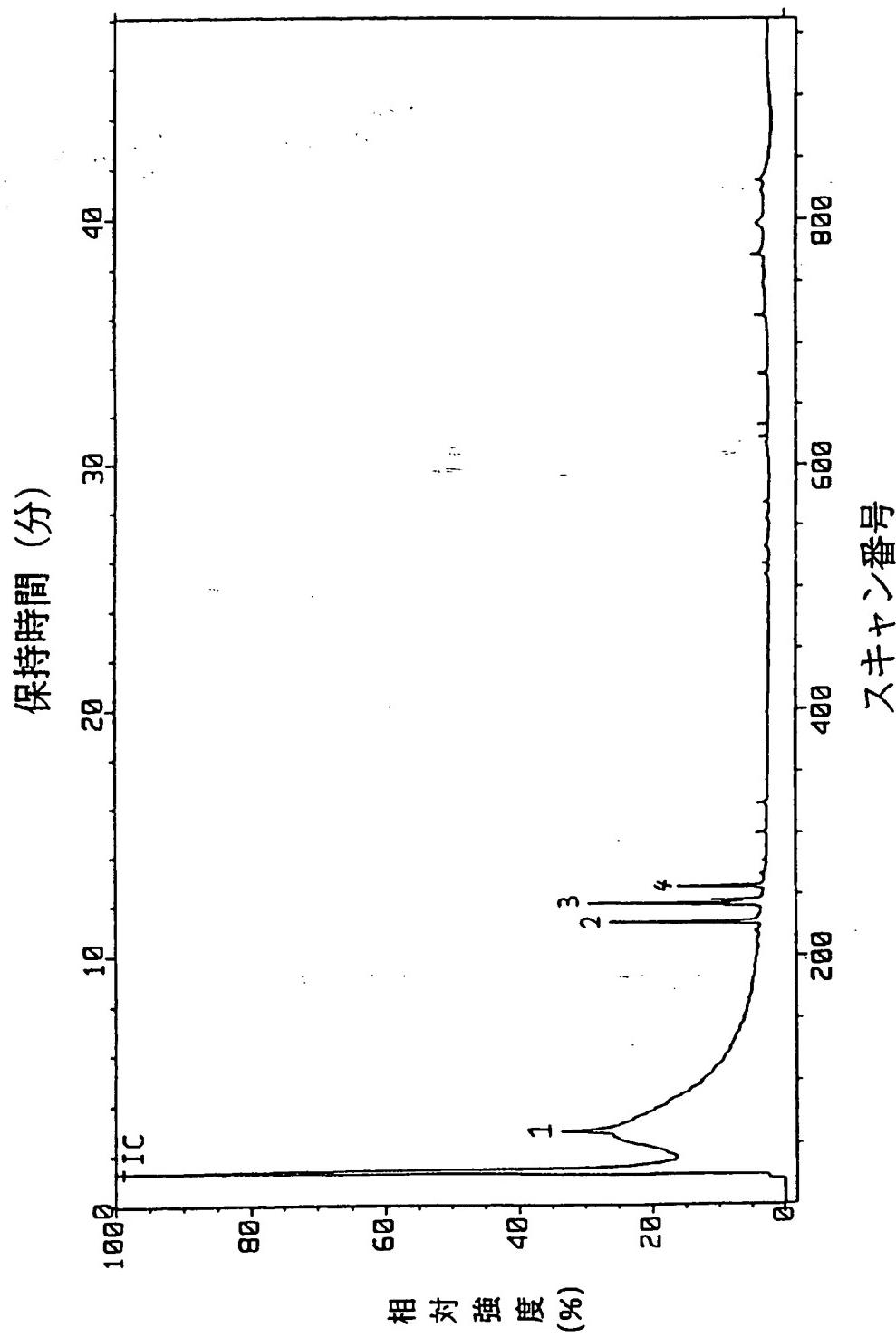
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 19



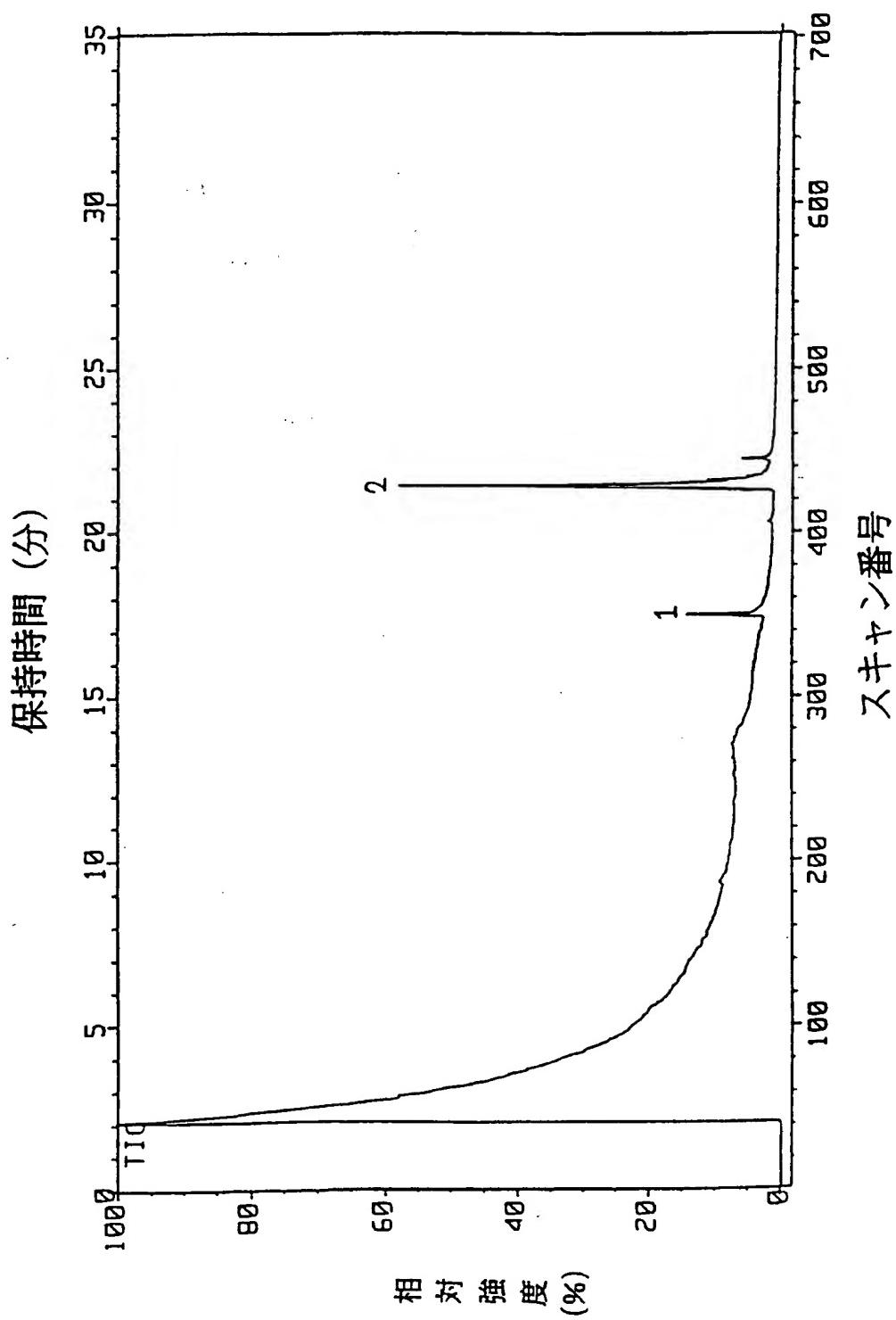
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図20



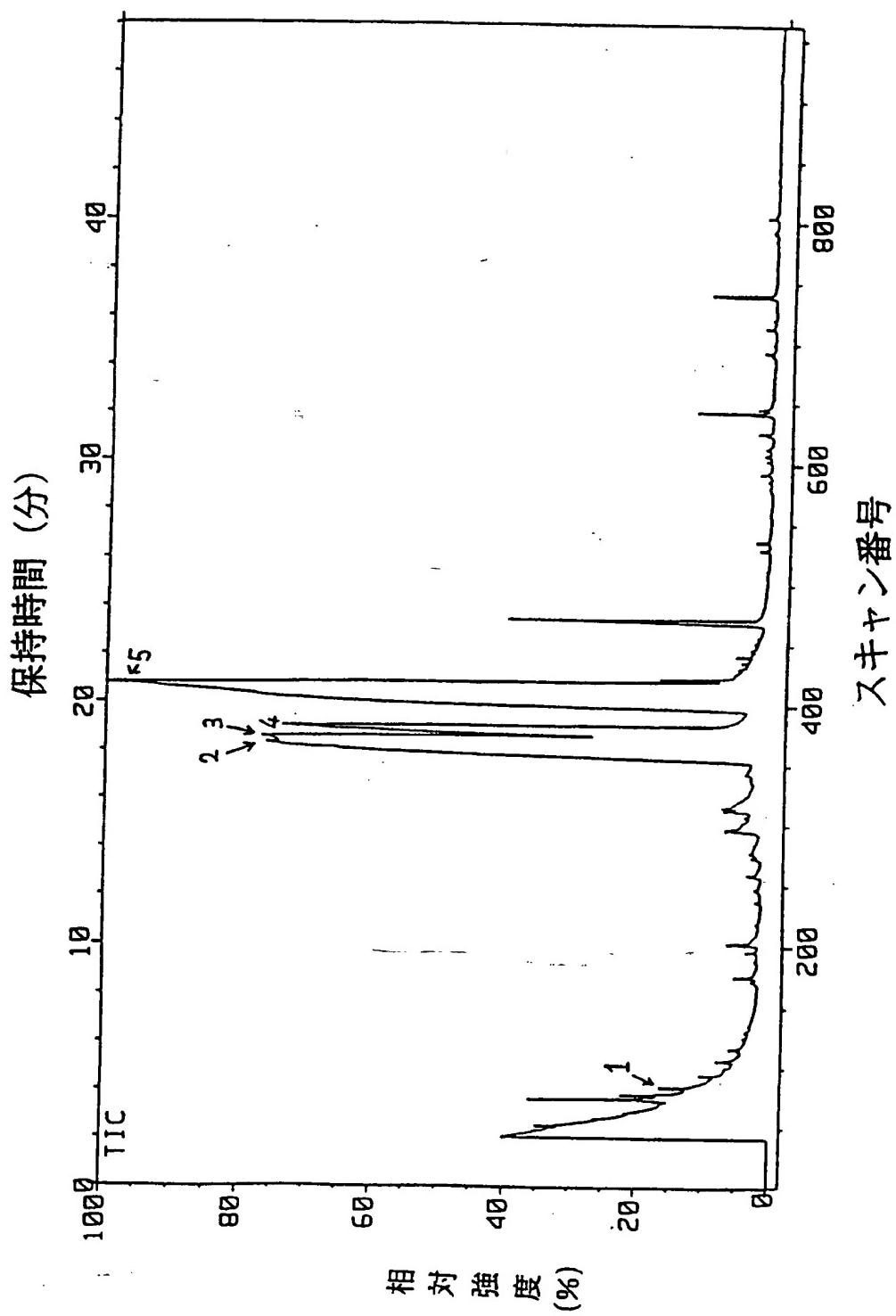
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図21



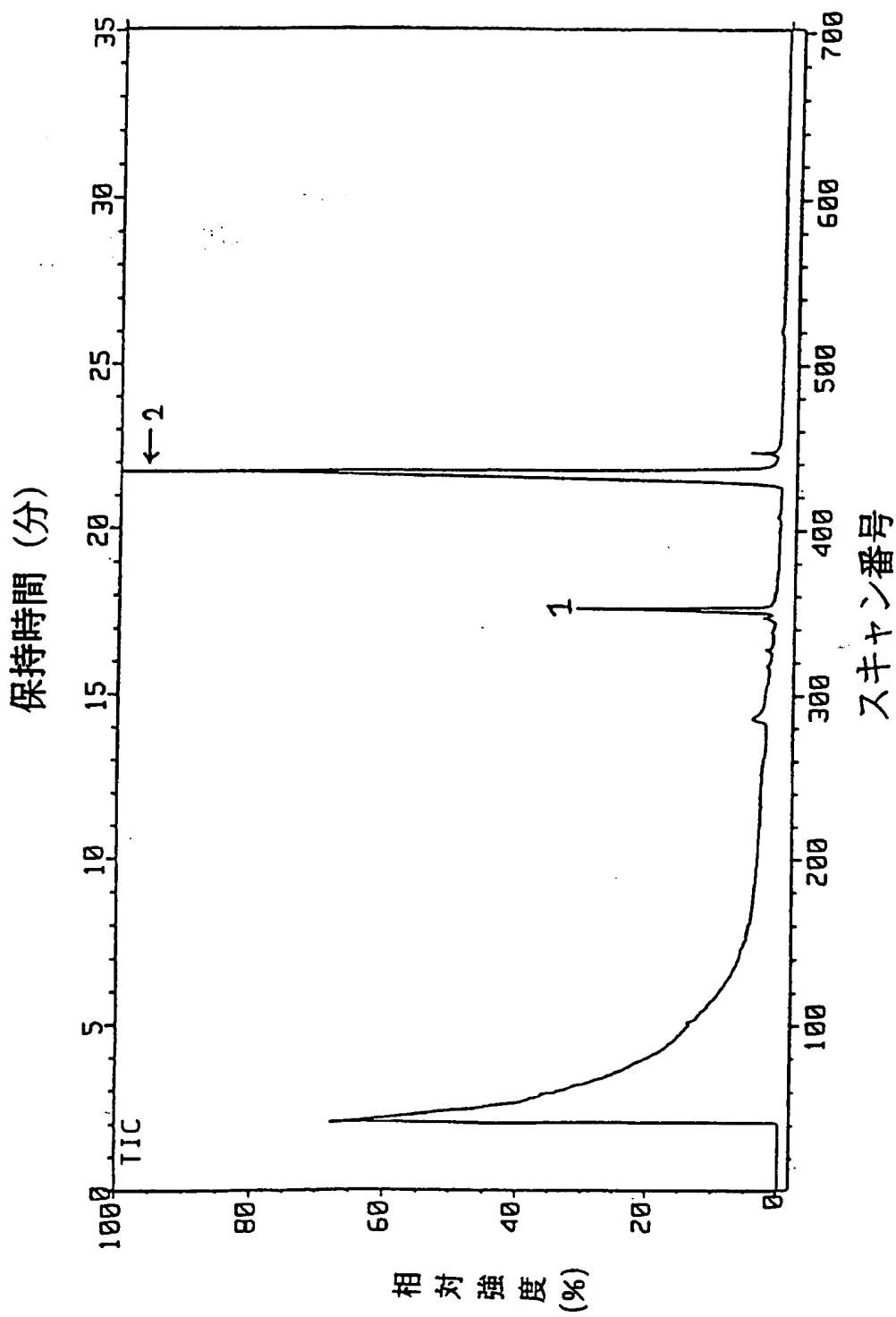
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図22



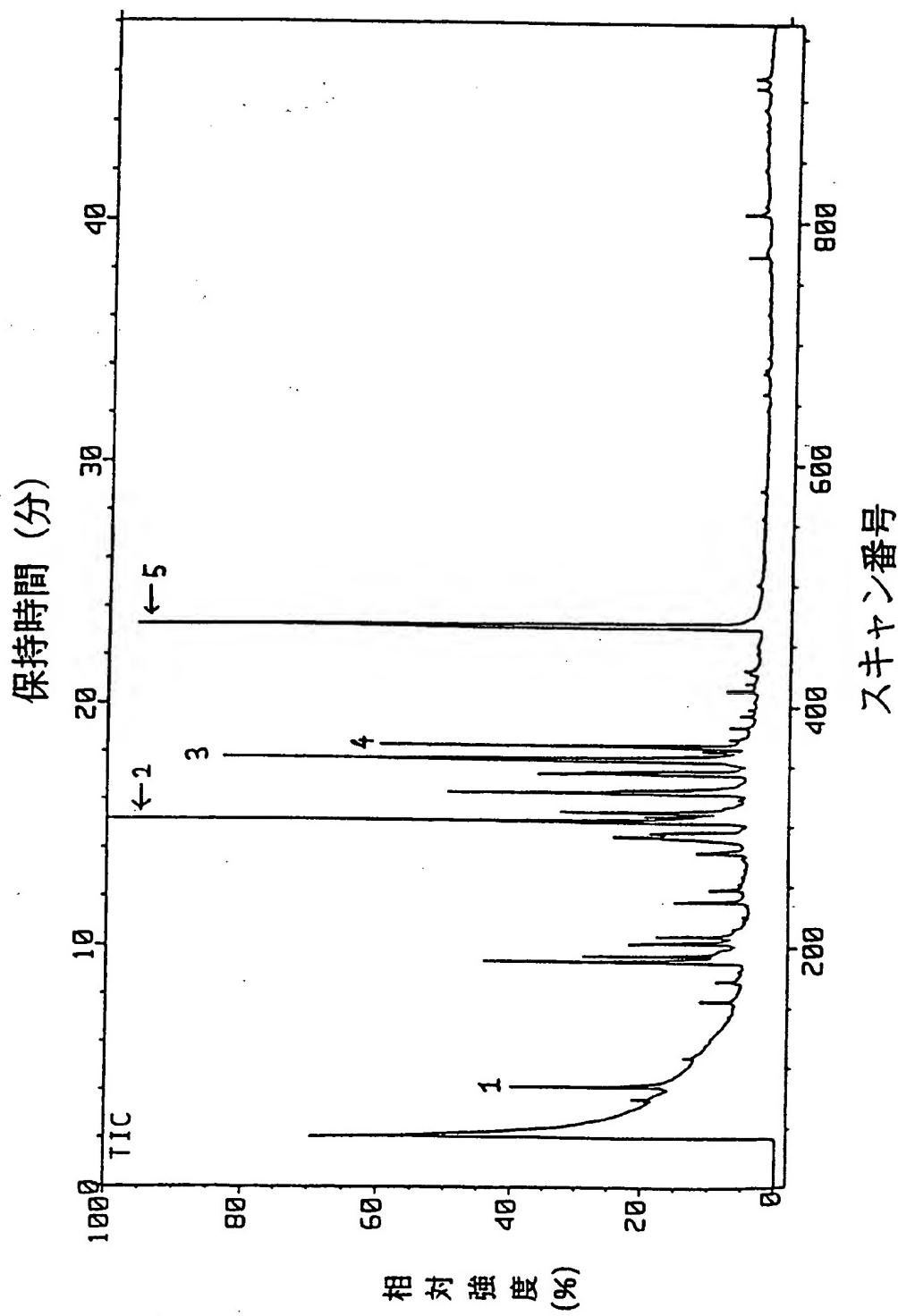
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図23



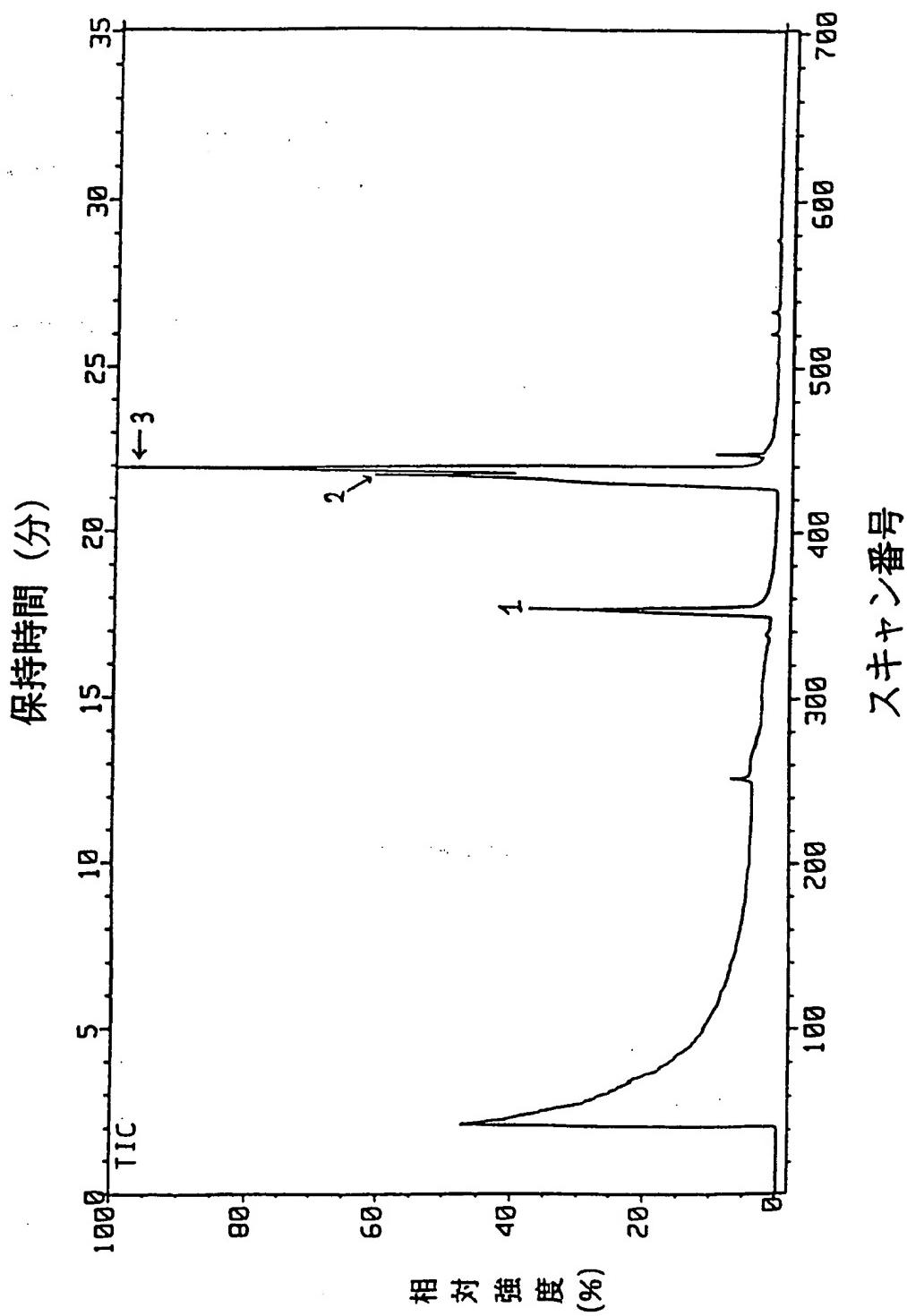
*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

図24



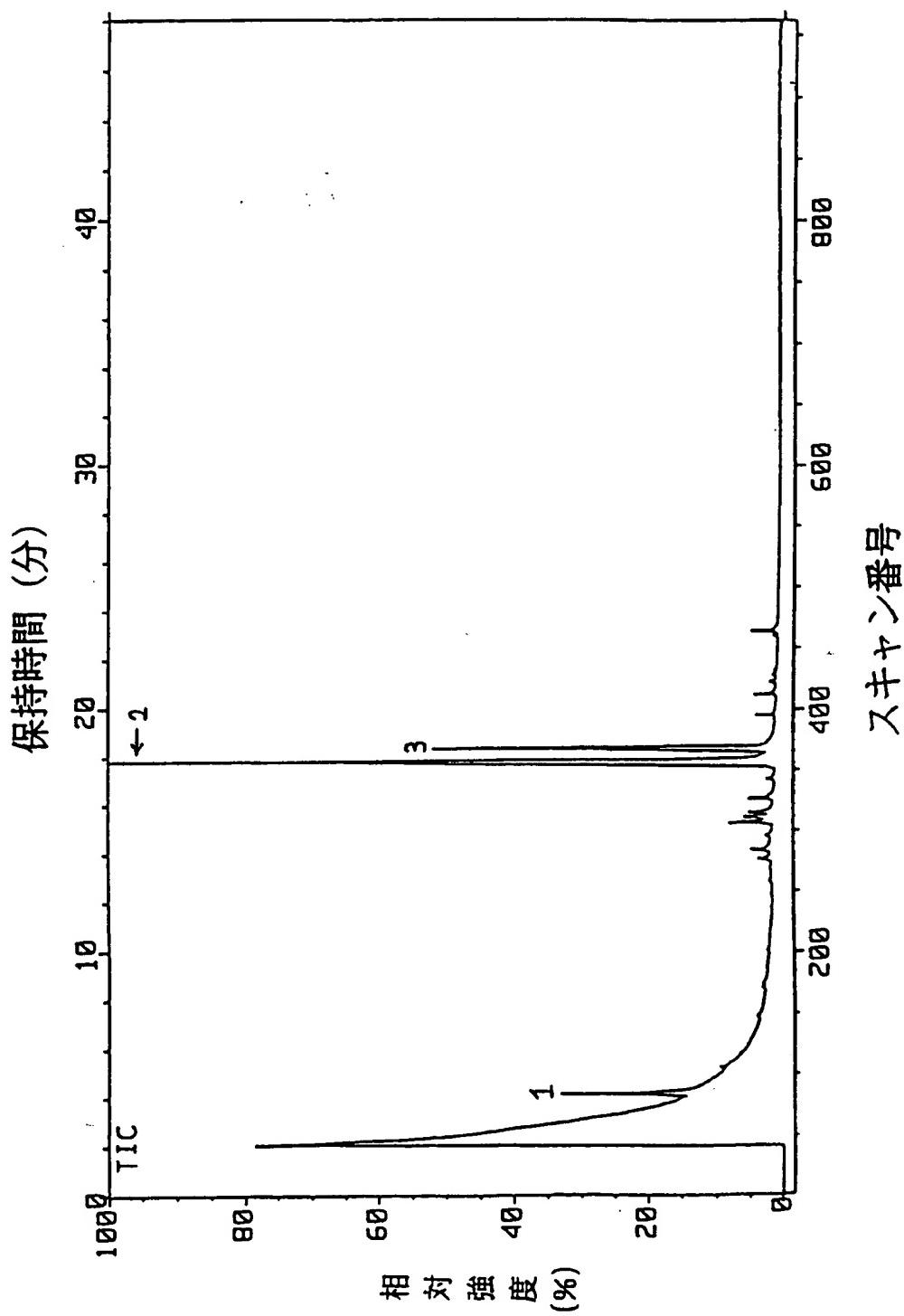
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図 25



**THIS PAGE BLANK (use pg 10)**

図26



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03997

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K35/78, 80, 84, 66, 38/00,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K35/78, 80, 84, 66, 38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 60-19716, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), January 31, 1985 (31. 01. 85), Full text (Family: none)	2 10 1, 3-9, 11-16
X	JP, 7-149786, A (Sagami Chemical Research Center), June 13, 1995 (13. 06. 95), Full text (Family: none)	2 10 1, 3-9, 11-16
Y	JP, 8-169891, A (Abi K.K.), July 2, 1996 (02. 07. 96), Full text (Family: none)	10
A	JP, 6-25002, A (Tsumura & Co.), February 1, 1994 (01. 02. 94), Full text & WO, 93/23033, A & AU, 9342722, A & EP, 642793, A	1 - 16

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 5, 1998 (05. 01. 98)

Date of mailing of the international search report

January 13, 1998 (13. 01. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Faxsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP97/03997

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-72888, A (Tsumura & Co.), March 15, 1994 (15. 03. 94), Full text (Family: none)	1 - 16

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03997

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' A 61K 35/78, 80, 84, 66, 38/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））  
Int.Cl' A 61K 35/78, 80, 84, 66, 38/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）  
CA-(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 60-19716, A (武田薬品工業株式会社), 31. 1月. 1985 (3 1. 01. 85), 全文 (ファミリーなし)	2
Y		10
A		1, 3-9, 11-16
X	JP, 7-149786, A (財団法人相模中央化学研究所), 13. 6月. 199 5 (13. 06. 95), 全文 (ファミリーなし)	2
Y		10
A		1, 3-9, 11-16
Y	JP, 8-169891, A (アビ株式会社), 2. 7月. 1996 (02. 07. 96), 全文 (ファミリーなし)	10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 05. 01. 98	国際調査報告の発送日 13.01.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官（権限のある職員） 富永 保 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3454

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03997

C(続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 6-25002, A (株式会社ツムラ), 1. 2月, 1994 (01. 02. 94), 全文&WO, 93/23033, A&AU, 9342722, A&EP, 642793, A	1-16
A	JP, 6-72888, A (株式会社ツムラ), 15. 3月, 1994 (15. 03. 94), 全文(ファミリーなし)	1-16

09/269711

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 F 3511 P T	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP97/03997	国際出願日 (日.月.年) 31.10.97	優先日 (日.月.年) 08.11.96
国際特許分類 (IPC) Int.Cl° A 61K 35/78, 80, 84, 66, 38/00		
出願人（氏名又は名称） 賀酒造株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 38 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I  国際予備審査報告の基礎
- II  優先権
- III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV  発明の単一性の欠如
- V  PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI  ある種の引用文献
- VII  国際出願の不備
- VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 19.02.98	国際予備審査報告を作成した日 02.11.98
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 富永 保印 電話番号 03-3581-1101 内線 3454

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする）

 出願時の国際出願書類

<input checked="" type="checkbox"/>	明細書 第	ページ、	出願時のもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	明細書 第	ページ、	10.07.98 付の書簡と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	明細書 第 1 - 3 6	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	明細書 第	ページ、	
<input checked="" type="checkbox"/>	請求の範囲 第 4 - 8, 12 - 16	項、	出願時に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	請求の範囲 第	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	請求の範囲 第	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	請求の範囲 第 1, 3, 9, 11	項、	10.07.98 付の書簡と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	請求の範囲 第	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	図面 第 1 - 2 6	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	図面 第	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	図面 第	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/>	図面 第	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 補正により、下記の書類が削除された。

<input checked="" type="checkbox"/>	明細書 第	3 7	ページ
<input checked="" type="checkbox"/>	請求の範囲 第	2, 10	項
<input type="checkbox"/>	図面 第		ページ/図

- 3  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（PCT規則70.2(c)）

4. 追加の意見（必要ならば）

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1, 3-9, 11-16 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1, 3-9, 11-16 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1, 3-9, 11-16 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

2. 文献及び説明

文献1 : J P, 60-19716, A

文献2 : J P, 7-149786, A

文献3 : J P, 8-169891, A

文献4 : SURETTE, Marc E. et al., Biochemistry, (1996), 35(28), p. 9187-96

文献5 : BOGGS, Kevin P. et al., J. Biol. Chem., (1995), 270(19), p. 11612-18

文献6 : JAYADEV, S. et al., J. Biol. Chem., (1995), 270(5), p. 2047-52

文献7 : ROBERTSON Noreen M. et al., Cancer Res., (1995), 55(3), p. 548-56

説明 :

国際調査報告で引用された上記文献1-3ないしこの予備審査報告書で新たに引用された上記文献4-7には、請求の範囲1, 3-9, 11-16に記載された発明は記載も示唆もされていないから、請求の範囲1, 3-9, 11-16は新規性・進歩性を有する。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日, 月, 年)	出願日 (日, 月, 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日, 月, 年)
--------------	------------------	------------------	------------------------------

WO, 97/04765, A1  
[P, A]

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日, 月, 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日, 月, 年)
-----------------	------------------------------	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO,**

## 明細書

### アポトーシス誘発剤

#### 発明の属する技術分野

本発明は、健康増強に有用な植物、微生物又は動物由来の生理活性物質を有効成分とし、医薬として有用なアポトーシス誘発剤、該生理活性物質を含有する機能性食品又は飲料、及びこれらの製造方法に関する。

#### 従来の技術

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を基にプログラム死遺伝子タンパク質が生合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要若しくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

近年、セラミドを中心とするスフィンゴ脂質とアポトーシスの関連が注目され、パルミチン酸、ステアリン酸によりセラミドのデノボ (de novo) 合成が起こり、それによってアポトーシスが誘導されることも報告されている [ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、第272巻、第3324～3329頁 (1997)]。

#### 発明が解決しようとする課題

セラミドや遊離脂肪酸はアポトーシス誘発剤としての開発が期待されているが

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

、生体由来の他の脂溶性物質のアポトーシス誘発作用は全く不明である。

本発明の目的は、植物、微生物又は動物由来のアポトーシスを誘発する作用を有する安全性の高い抽出画分を開発し、該画分を含有するアポトーシス誘発剤、該画分を構成成分とする機能性食品又は飲料、及びそれらの製造方法を提供することにある。

#### 課題を解決するための手段

本発明者らは、かかる目的を達成するために鋭意検討した結果、植物、微生物又は動物より得られる分子構造中にリン酸エステル及びホスホン酸エステルを含有しない、グリセロ脂質、グリセロ糖脂質が強いアポトーシス誘発作用を有することを見出し、本発明を完成させた。

即ち、本発明の第1の発明はアポトーシス誘発剤に関し、分子構造中にリン酸エステル及びホスホン酸エステルを含有しない、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とすることを特徴とする。

本発明の第2の発明は本発明の第1の発明の剤の製造方法に関し、本発明の第1の発明の剤の製造方法において、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第3の発明は分子構造中にリン酸エステル及びホスホン酸エステルを含有しない、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなるアポトーシス誘発用食品又は飲料に関する。

本発明の第4の発明は本発明の第3の発明の食品又は飲料の製造方法に関し、

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

本発明の第3の発明の食品又は飲料の製造方法において、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

#### 図面の簡単な説明

図1は透析内液のD E A E - S e p h a r o s e F a s t F l o w カラムによる溶出パターンを示す図である。

図2はB画分及び精製物のアポトーシス誘発作用を示す図である。

図3は精製物のN M Rスペクトルを示す図である。

図4は試料Aの全イオンクロマトグラムを示す図である。

図5は試料Bの全イオンクロマトグラムを示す図である。

図6はセファロースL H - 60カラムクロマトグラフィーを示す図である。

図7は分画番号20の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図8は分画番号21の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図9は分画番号23の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図10は分画番号20の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図11は分画番号21の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図12は分画番号23の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図13はクロロホルム溶出画分の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図14はクロロホルムとアセトンの比が80:20の溶出画分の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図15はクロロホルム溶出画分の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図16はクロロホルムとアセトンの比が80:20の溶出画分の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図17はR<sub>f</sub>値約0.25のスポットの脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図18はR<sub>f</sub>値約0.25のスポットの糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図19はR<sub>f</sub>値約0.33のスポットの脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図20はR<sub>f</sub>値約0.33のスポットの糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図21はブナシメジのエタノール抽出液中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図22はブナシメジのエタノール抽出液中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図23は抹茶のエタノール抽出液中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図24は抹茶のエタノール抽出液中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図25は米糠の75%エタノール抽出物中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

図26は米糠の75%エタノール抽出物中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。

### 発明の実施の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明で使用するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は分子構造中にリン酸エステル及びホスホン酸エステルを含有しないことを除けば特に限定はなく、植物、微生物又は動物から製造しても良く、また化学的に合成しても良い。

本発明において使用できる植物、微生物又は動物としては、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物であれば良く、特に限定はないが、植物としては、例えば、ほうれん草、人参、タマネギ等の野菜類、茶類等の双子葉植物、麦、米等の单子葉植物、コショウ、

*THIS PAGE BLANK (USPTO)*

ナツメッグ、ニンニク、ローリエ、セロリー、マスタード、ショウガ、トウガラシ、タイム、サフラン、シナモン、バニラ、オールスパイス、カラシ、クレソン、サンショウ、シソ、ハーブ、八角、バジル、ニラ、ホップ、ワサビ等の香辛料原料、穀物カス等のこれらの植物加工物、褐藻類、紅藻類、緑藻類、単細胞緑藻類等の藻類、微生物としてはキノコ類、酵母、糸状菌、例えば麹菌、細菌、例えば納豆菌、乳酸菌、動物としては脊椎動物又は無脊椎動物等が例示される。

本明細書でいう茶類とは、一般に茶と呼ばれるものであればよく、例えば非発酵茶として、緑茶、煎茶、番茶、ほうじ茶、抹茶が、半発酵茶として、パイパオ茶、ウーロン茶、パオチョン茶が、発酵茶として紅茶が、後発酵茶としてプアール茶が挙げられる。このほかに、マテ茶、クコ茶、ハトムギ茶、麦茶等もここでいう茶類に含まれる。

本明細書でいうキノコ類とは、特に限定は無いが、一般に食されているものであるのが好ましく、例えば、ブナシメジ、ハタケシメジ、シイタケ、マツタケ、ホンシメジ、エノキタケ、ナメコ、イワタケ、キクラゲ、キヌガサタケ、クリタケ、クロカワ、コウタケ、ショウロ、タマゴタケ、チチタケ、ナラタケ、ハツタケ、ヒラタケ、マイタケ、マツオウジ、マッシュルーム等の担子菌類、冬虫夏草等の子のう菌類が例示される。

本明細書でいう藻類とは、特に限定は無いが、フクロノリ、モズク、真昆布、ガゴメ昆布、ワカメ、アラメ、ヒジキ等の褐藻類、テングサ、イギス等の紅藻類、アオサ、カワノリ、ミル等の緑藻類、クロレラ等の単細胞緑藻類等が例示される。

本明細書でいう穀物カスとは、特に限定は無いが、米糠、小麦ふすま、麦根、おから等が例示される。

本発明においては食品として利用されている、これらの茶類、キノコ類、藻類、穀物カスより、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を調製し、アポトーシス誘発剤、機能性食品又は飲料の有効成分として使用することが好ましい。

本発明において使用するアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質、グリセ

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ロ糖脂質は特に限定ではなく、グリセロ脂質としてはモノー、ジー及びトリーアシリグリセロールが使用でき、グリセロ糖脂質としては疎水性部分にグリセロールをもつ糖脂質、例えば疎水性基としてはモノアシル基、ジアシル基、アルキルアシル基、ジアルキルアシル基、アルケニルアシル基、ジビフィタニルエーテル等の疎水基を有するグリセロ糖脂質、例えば中性グリセロ糖脂質としてはモノガラクトシルジアシルグリセロール、モノグリコシルジアシルグリセロール、ジガラクトシルジアシルグリセロール、ジグリコシルジアシルグリセロール、ジマンノシルジアシルグリセロール、トリグリコシルジアシルグリセロール、テトラグリコシルジアシルグリセロール、ポリグリコシルジアシルグリセロール、酸性グリセロ糖脂質としてはセノリピド、スルホキノボシルジアシルグリセリド、グルクロノシルジアシルグリセロール等が使用できる。

本発明で使用するグリセロ脂質、グリセロ糖脂質の構成脂肪酸は飽和及び／又は不飽和脂肪酸、例えばテトラデカン酸（ミリスチン酸、C<sub>14</sub>:0）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸、C<sub>16</sub>:0）、テトラデセン酸（ミリストレン酸、C<sub>14</sub>:1）、ヘキサデセン酸（パルミトレイン酸、C<sub>16</sub>:1）、オクタデセン酸（オレイン酸、C<sub>18</sub>:1）、シス-9,シス-12-オクタデカンジエン酸（リノレン酸、C<sub>18</sub>:2）、9,12,15-オクタデカトリエン酸（リノレン酸、C<sub>18</sub>:3）等が例示され、構成糖としてはフコース、キシロース、マンノース、ガラクトース、グルクロン酸、グルコース、ガラクトース、マンニトール、ミオイノシトール等が例示される。またグリセロ糖脂質としては糖脂質と糖類及び／又はタンパク質との複合体等が包含される。

本発明に使用する植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は有機溶媒、例えば含水親水性有機溶媒、例えば含水エタノールによる抽出工程を包含する製造方法により、簡便に製造することができるが、当該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の製造方法においては特に限定ではなく、単なる水抽出を含め、当該グリセロ脂質及び／又はグ

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

リセロ糖脂質の精製に使用できる公知の方法を使用することができる。また植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を化学的、物理的、又は酵素学的に処理した後に、目的のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を精製しても良い。精製に際しては、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の理化学的性質、又はアポトーシス誘発作用等の生理活性を指標にして精製しても良い。

本発明において、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は有機溶媒、例えばヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、又はアセトン、プロパノール、エタノール、メタノール等の親水性有機溶媒、これらの混合溶媒、又はこれらと水との混合溶媒で抽出され、例えば含水エタノールによる抽出工程を包含する製造方法により、食品に適したグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を簡便に製造することができる。食品又は飲料に使用する場合、好適には抽出条件として、有機溶媒、特に親水性有機溶媒、例えば10～95%、好ましくは20～80%エタノール水溶液で、通常数分～数日間、好ましくは數十分から數十時間、通常10°C～70°C、好ましくは20～60°Cで抽出することにより効率よくアポトーシス誘発化合物であるグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が抽出される。また、有機溶媒、特に親水性有機溶媒で抽出する前に、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を酸、又はアルカリで処理することにより、更に効率よくアポトーシス誘発化合物であるグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が抽出される。

本発明で使用するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の純化されたものを採取する方法としては、ブライーダイアー (B l i g h - D y e r) 法、フォルチ (F o l c h) 分配法等の公知の方法（日本生化学会編、新生化学実験講座、第4巻、脂質 I I I 、糖脂質、第104～109頁、1990年、東京化学同人）があり、目的に応じ、本発明で使用するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の抽出に用いることができる。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

本発明において使用するグリセロ脂質、グリセロ糖脂質の精製においては、上記抽出物を疎水性担体、逆相担体、順相担体等を用いたクロマトグラフィーにかけることにより、更に効率よく分離することができる。

疎水性担体としての限定は無く、公知の担体を使用すれば良いが、該担体としてはブチル基、オクチル基、フェニル基を導入したセファクリル系、セファロース系、トヨパール系等の樹脂、XAD-1、2、4、200、7、8等のアンバーライト吸着樹脂等が例示される。また逆相担体としての限定は無く、公知の担体を使用すれば良いが、該担体としてはアルキル鎖を共有結合させたシリカゲルが例示される。更に順相担体としての限定は無く、公知の担体を使用すれば良いが、該担体としてはシリカゲルが例示される。なお精製に際しては、グリセロ脂質、グリセロ糖脂質の理化学的性質、又はアポトーシス誘発作用等の生理活性を指標にして精製することができる。

本発明で使用する植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は例えば食用植物、食用微生物、食用動物の含水エタノール抽出物から通常のイオン交換樹脂処理、疎水クロマト処理、ゲルろ過処理等で精製することができます。

一般的には、植物、微生物又は動物中のグリセロ脂質、グリセロ糖脂質は膜近辺に糖類及び／又はタンパク質と結合した高分子の形態で存在している場合が多く、例えば熱水で抽出することによりグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質と糖類及び／又はタンパク質が結合したグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を得ることができる。なお糖類とは植物、微生物又は動物中に存在する糖質であり、单糖、オリゴ糖、多糖、複合糖質を包含する。

本発明においてはこのように得られた高分子のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物をそのまま用いても良いが、使用目的に応じて、糖類及び／又は

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

タンパク質を酵素的、化学的、及び／又は物理的に処理し、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を精製、採取することにより、より純化されたグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を得ることが可能である。

上記方法で得られた本発明で用いられるグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物は天然より得られる安全性の高い物であり、食品及び／又は飲料用として特に有用である。

得られたグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質はモノクローナル抗体等の標的細胞を認識するリガンドと結合させることにより、任意の標的細胞に特異的にアポトーシスを誘発させることができる。更にアルブミン等の担体と本発明の化合物を結合させることにより、より吸収性の高い物質が提供される。

本発明のアポトーシス誘発剤は、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればよい。一般的には、本発明のアポトーシス誘発化合物、例えばグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

本発明のアポトーシス誘発剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターク、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるアポトーシス誘発性を有する、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

本発明のアポトーシス誘発剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も含まれる。

本発明のアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当たり0.1～200mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

本発明のアポトーシス誘発剤により提供されるアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん等の疾患との関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。特に、食品として長い歴史を有する植物、微生物又は動物より調製したアポトーシス誘発化合物であるグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は、経口投与の場合において、安全性の高いものである。また本発明の

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は当然安全性は高く、そのアポトーシス誘発作用により、健康食品として極めて有用である。

本発明の食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆等）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料等）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類等）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウォッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュール等）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料等）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりん等）、香辛料（ニンニク、コショウ、トウガラシ、ナツメッグ、ショウガ、八角、ハーブ、バジル等の抽出物等）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥又は濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープ等）、冷凍食品（すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーカステーキ、シュウマイ、餃子、各種ステイック、フルーツカクテル等）、固形食品、液体食品（スープ等）、香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料にグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有されていれば良い。

調理及び加工においては、調理、加工後にアポトーシス誘発性を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有されていれば良い。

すなわち調理・加工前、調理・加工時、更には調理・加工後にアポトーシス誘発性を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を添加してもよいし、調理・加工品やその材料を、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物に添加し、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を希釈してもよい。

次に食品又は飲料の製造においては、任意の工程でアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有させれば良い。含有させる方法としては該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を添加してもよいし、食品又は飲料やその原料を、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質に添加し、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を希釈してもよい。また、添加は1回又は数回に渡って行ってもよい。したがって、アポトーシス誘発作用を有する食品又は飲料を簡便に製造することができる。いずれの工程を経た場合も、アポトーシス誘発性を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有する食品又は飲料、本発明のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は本発明の食品又は飲料と定義される。

本発明のアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の食品中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えば該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂

**THIS PAGE BLANK (uspto)**

質の含有量は食品 100 部当り  $10^{-9}$  部以上、食品としての官能、生理作用の面からは好ましくは  $10^{-8}$  ~ 5 部、更に好ましくは  $10^{-7}$  ~ 2 部である。

本発明のアボトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば、植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の飲料中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えば該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の含有量は飲料 100 部当り  $10^{-9}$  部以上、飲料としての官能、生理作用の面からは好ましくは  $10^{-8}$  ~ 5 部、更に好ましくは  $10^{-7}$  ~ 2 部である。なお、本明細書において部は重量部を意味する。

本発明の食品又は飲料としては、本発明のアボトーシス誘発性を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

本発明の食品又は飲料は生理活性を有する本発明のアボトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を多量に含有し、該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の有するアボトーシス誘発作用によって、これらを摂取することにより、特に胃腸健康保持に有用な食品又は飲料である。

本発明のアボトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は植物、微生物又は動物由来であり、特に食用植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の食品又は飲料への使用は極めて安全性に優れたものであり、当該アボトーシス誘発化合物は生理的機能発現濃度において動物に対する毒性は認められない。

食用植物、微生物又は動物中の本発明のアボトーシス誘発化合物のグリセロ脂

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

質及び／又はグリセロ糖脂質は食品として長い歴史を有するものであり、これらから調製した本発明のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物は、経口投与の場合において、極めて安全性の高いものである。したがって、当該グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は当然安全性は高い。

以上、本発明により生体脂質であるグリセロ脂質及びグリセロ糖脂質がアポトーシス誘発活性を有することが明らかとなった。

本発明に使用するアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は植物、微生物又は動物の膜画分に多量に存在し、特に食用植物又は微生物より安価にかつ簡便に製造できる。またその疎水性の度合いにより、好適な溶媒を選択することにより、目的のアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を選択的に精製することができる。

本発明に使用するアポトーシス誘発化合物のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は、そのアポトーシス誘発作用を食品又は飲料に簡便に付与することができ、本発明のアポトーシス誘発性をもつグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は食品又は飲料への添加剤として極めて有用である。

### 実施例

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における%は重量%を意味する。

### 実施例 1

#### 海藻からのアポトーシス誘発作用を有する組成物の調製

(1) ガゴメ昆布を充分乾燥後、乾燥物 20 kg を自由粉碎機（奈良機械製作所製）により粉碎した。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

水道水 900 リットルに塩化カルシウム二水和物（日本曹達社製）7.3 kg を溶解し、次にガゴメ昆布粉碎物 20 kg を混合した。液温 12°C から液温 90 °C となるまで水蒸気吹込みにより 40 分間昇温させ、次いでかくはん下 90 ~ 95 °C に 1 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 1100 リットルを得た。

次いで固液分離装置（ウエストファリアセパレーター社製 CNA 型）を用い、冷却物の固液分離を行い、約 900 リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液 360 リットルをダイセル社製 F E 10 - F C - F U S 038 2 （分画分子量 3 万）を用い、20 リットルまで濃縮した。次いで水道水を 20 リットル加え、また 20 リットルまで濃縮するという操作を 5 回行い、脱塩処理を行い、ガゴメ昆布由来の抽出液 25 リットルを調製した。

該溶液 1 リットルを凍結乾燥し、乾燥物 13 g を得た。

(2) 実施例 1 - (1) 記載の抽出液 1.4 リットルを、0.2 M CaCl<sub>2</sub> 含有 20 mM 酢酸緩衝液、pH 6 で透析し、透析内液を得た。DEAE-Sepharose Fast Flow カラム (φ 14 cm × 45.5 cm) を同緩衝液にて平衡化し、透析内液をアプライ後、同緩衝液で洗い、2 M NaCl 含有同緩衝液にて濃度勾配法により溶出させた。フェノール硫酸法及びカルバゾール硫酸法にて、総糖含量及びウロン酸含量を求め、溶出順に A 画分、B 画分及び C 画分を得た。これらを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥し、B 画分 760 mg を得た。

この B 画分にアポトーシス誘発活性が認められた。

図 1 に抽出液の DEAE-Sepharose Fast Flow カラム溶出パターンを示す。すなわち図 1 は海藻由来抽出物の DEAE-Sepharose Fast Flow カラム (φ 14 cm × 45.5 cm) の溶出パターンを示す図であり、縦軸はカルバゾール硫酸法での 530 nm の吸光度、フェノール硫酸法での 480 nm の吸光度、及び電導度 (mS/cm) 、横軸はフラクション番号を示し、図中白丸印がフェノール硫酸法での 480 nm の吸光度、黒丸

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

印がカルバゾール硫酸法での 530 nm の吸光度、図中実線が電導度を示す。なお 1 フラクションの液量は 1000 ml である。

(3) 上記方法にて分画した B 画分 8.6 g を最終濃度 1 MNaCl に調製し、1 MNaCl で平衡化した Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow カラム ( $\phi 4.4 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ ) にアプライした。1 MNaCl でカラムを洗浄後、水への濃度勾配により溶出される画分を得た。これをロータリーエバポレーターにて濃縮後、蒸留水に対して透析し、約 6.5 ml の精製画分を得た。精製画分を凍結乾燥し、精製物 60 mg を得た。この精製物にアポトーシス誘発活性が認められた。

#### (4) 精製物のアポトーシス誘発作用の測定

上記 B 画分、及び実施例 1 - (3) 記載の精製物につきアポトーシス誘発活性を以下の通りに測定した。牛胎児血清 10% を含有する RPMI 1640 培地にて培養した HL-60 (ATCC CCL-240)  $2.5 \times 10^5$  個 / 4.5 ml に、B 画分又は該精製物の水溶液 0.5 ml を添加し、37°C、48 時間培養した。同時に対照試料として、蒸留水及びアポトーシス誘発活性を有することが判っているアクチノマイシン D 溶液 (10 μg / ml) を添加した。光学顕微鏡下で、アポトーシス小体の形成、細胞の収縮、核の凝縮を肉眼観察し、生細胞数をカウントした。これらの現象が観察され、生細胞数の減少が認められるものを、アポトーシス誘発活性有りと判断した。

B 画分、精製物及びアクチノマイシン D 添加においてアポトーシス誘発作用が確認された。その結果を図 2 に示す。すなわち図 2 は上記 HL-60 細胞の培養液に最終濃度 2 mg / ml の B 画分又は最終濃度 0.9 mg / ml の精製物を添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間 (時間)、縦軸は培養液中の生細胞数 ( $\times 10^5$  個 / 5 ml) を示す。図中白四角形印は水添加の対照、白ひし形印は B 画分添加、白丸印は精製物添加をそ

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

れぞれ示す。

(5) アポトーシス誘発作用を有する精製物の理化学的性質

実施例 1 - (3) 記載の精製物の理化学的性質を測定した。

(i) NMR 分析

J NM-A 500 核磁気共鳴装置（日本電子社製）を用いて  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定した。

その結果を図 3 で表される  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルで示した。図 3 において縦軸はシグナルの強度、横軸は化学シフト値 (ppm) を示す。なお、 $^1\text{H}$ -NMR での化学シフト値は HOD の化学シフト値を 4.65 ppm として表した。

$^1\text{H}$ -NMR (D<sub>2</sub>O)

$\delta$  0.7 (脂肪酸の末端のメチルの H)、1.1(脂肪酸のメチレン及びフコースの C-5位のメチルの H)、3.1 ~ 5.6 (糖に由来する H)

(ii) GC-MS 分析

実施例 1 - (3) 記載の精製物 2 mg を取り、5% 塩酸メタノール溶液 1 ml を加え封管し、85°C で 3 時間加熱した。冷後、n-ヘキサン 1 ml で 3 回抽出し、得られた n-ヘキサン抽出液を窒素気流で約 500 μl に濃縮し、試料 A とした。

残りのメタノール層に炭酸銀を加え中和した後、ろ過し、ろ液に窒素気流を吹付けて濃縮乾固し、真空ポンプで 4 時間乾燥した。乾燥後、残渣に TMS 試薬 (ヘキサメチルジシラザン 2.6 ml を乾燥ピリジン 2.0 ml に加え、次いでトリメチルクロルシラン 1.6 ml を加えた後、生じた白濁物質を遠心分離して除いた上清を使用) 5 滴を加え、室温に 30 分間放置した。次いで、50°C で 10 分間加温し、冷後、クロロホルム 1 ml を加えかくはん後、クロロホルム層を水 1 ml で 3 回洗浄した。得られたクロロホルム溶液を試料 B とした。

上記、試料 A 及び B を DX-302 質量分析計（日本電子社製）を用いて下記

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

条件でGC-MS分析に供した。

試料A

カラム：TC-1（ジーエルサイエンス）30 m×0.25 mm I.D.

温度：130 °Cから250 °Cまで 4°C/minの昇温、250 °Cで5分間の維持

流量：ヘリウムガス、1.2 ml/min

マススペクトル測定質量範囲：m/z 50～500

マススペクトル測定繰り返し時間：3秒

試料B

カラム：TC-1（ジーエルサイエンス）30 m×0.25 mm I.D.

温度：130 °Cから300 °Cまで 4°C/minの昇温、300 °Cで5分間の維持

流量：ヘリウムガス、1.2 ml/min

マススペクトル測定質量範囲：m/z 50～800

マススペクトル測定繰り返し時間：3秒

その結果、試料A、試料Bはそれぞれ図4、図5で表される全イオンクロマトグラムを示した。各図において縦軸は相対強度（%）、横軸上部は保持時間（分）、下部はスキャン番号を示す。

試料A、試料Bより得られたクロマトグム中のピークの構造の確認はそれぞれのピークのマススペクトルを解析することにより行った。

試料Aからは主成分としてテトラデカン酸（ミリスチン酸）（ピーク2）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸）（ピーク3）、及びテトラデセン酸（ピーク1）の各メチルエステルが確認された。

また、試料Bからはグリセロール由来のピーク（ピーク1）、フコース由来のピーク（ピーク2、3、4）、キシロース由来のピーク（ピーク5、6）、マンノース由来のピーク（ピーク7）、ガラクトース由来のピーク（ピーク8、9、10）、及びグルクロン酸由来のピーク（ピーク11）が確認された。

以上、上記精製物にはグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有されてい

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ることが判明した。

### 実施例 2

(1) 乾燥ガゴメ昆布の粉碎物 2 kg を 20 リットルの 80% エタノール中に懸濁し、25°Cで 3 時間かくはんし、濾過により可溶物を除去した。得られた残さを、1.5 ユニットのエンド型コース硫酸含有多糖分解酵素 (WO 97/26896 参照)、10% のエタノール、100 mM 塩化ナトリウム、50 mM 塩化カルシウムを含む 20 リットルの緩衝液 (pH 8.2) に懸濁し、25°Cで 24 時間かくはんした。次にこのかくはん液をろ過し、残さを 50 mM 塩化ナトリウムを含む 10% エタノールで洗浄した。洗浄された残さを 4 g のアルギン酸リーゼ (ナガセ生化学工業社製)、100 mM リン酸二水素ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム、及び 10% エタノールを含む緩衝液 (pH 6.6) 40 リットルに懸濁し、25°Cで 96 時間かくはんした。この溶液を遠心分離し、得られた上清を排除分子量 10 万のホローファイバーを装着した限外ろ過器により濃縮後、100 mM 塩化ナトリウムを含む 10% エタノールで溶液を置換した。この溶液に等量の 0.4 M 酢酸カルシウム溶液を添加し、30 分かくはん後、遠心分離し、得られた上清を上記と同条件で限外ろ過し、100 mM 塩化ナトリウムで溶液を置換した。この溶液に 1 M となるように塩化ナトリウムを添加し、pH 8 に調製し、ガゴメ昆布よりの抽出液 1.4 リットルを得た。

この抽出液を、1 M 塩化ナトリウムであらかじめ平衡化した 2.9 リットルのフェニルセルロファイン (生化学工業社製) カラムにかけ、6 リットルの 1 M 塩化ナトリウム、6 リットルの水、8 リットルのエタノールの順で溶出した。

各溶出画分のアポトーシス誘発作用を実施例 1-(4) 記載の方法で測定し、エタノール溶出画分にアポトーシス誘発作用が認められた。

エタノール溶出画分を濃縮乾固後、エタノールに溶解して 175 ml とし、そのうち 58 ml を、あらかじめエタノールで平衡化した 1130 ml のセファコース LH-60 (ファルマシア社製) カラムにかけてエタノールで溶出し、60 ml ずつ分取した。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

溶出パターンを図6に示す。すなわち図6はセファロースLH-60カラムクロマトグラフィーを示す図であり、縦軸は230nmの吸光度、横軸は分画番号を示す。

溶出画分のアポトーシス誘発活性を実施例1-(4)記載の方法で測定したところ、分画番号8~15の分画、27~49の分画には活性は無く、分画番号16~21、22~26の各々の分画にアポトーシス誘発作用が認められた。

この活性の強い分画のうち3分画(分画番号20、21、23)に関して、実施例1記載の方法で各種成分の分析を行った。

図7、8、9、10、11、12に分画番号20、21、23の各々の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図7、8、9は分画番号20、21、23の各々の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図10、11、12は分画番号20、21、23の各々の糖の成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度(%)、横軸上部は保持時間(分)、下部はスキャン番号を示す。

図7、10に示すように、分画番号20の分画からはテトラデカン酸(ミリスチン酸)(図7ピーク1)、ヘキサデカン酸(パルミチン酸)(図7ピーク3)、ヘキサデセン酸(図7ピーク2)、及びオクタデセン酸(オレイン酸)(図7ピーク4)のそれぞれのメチルエステル、グリセロール由来のピーク(図10ピーク1)、ガラクトース由来のピーク(図10ピーク2、3、4)が検出された。また図8、図11に示すように分画番号21の分画からはテトラデカン酸(ミリスチン酸)(図8ピーク1)、ヘキサデカン酸(パルミチン酸)(図8ピーク3)、ヘキサデセン酸(図8ピーク2)、及びオクタデセン酸(オレイン酸)(図8ピーク4)のそれぞれのメチルエステル、グリセロール由来のヒーク(図11ピーク1)、ガラクトース由来のピーク(図11ピーク2、3、4)が検出された。

また図9、図12に示すように分画番号23の分画からはヘキサデカン酸(パルミチン酸)(図9ピーク1)、及びオクタデセン酸(オレイン酸)(図9ピー

**THIS PAGE BLANK (USPS)**

ク2) の各々のメチルエステル、グリセロール由来のピーク（図12ピーク1）、ガラクトース由来のピーク（図12ピーク2、3、4）が検出された。

以上、上記分画にはグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が含有されていることが確認され、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質がアポトーシス誘発活性を有することが明らかとなった。

(2) 実施例2-(1)に記載のセファロースLH-60カラム溶出画分の分画番号16～26を集め、濃縮乾固後、乾固物をクロロホルムに溶解し、あらかじめクロロホルムで平衡化した200mlのイアトロビーズ 6RS-8060(ヤトロン社製)カラムにかけ、クロロホルムで溶出し、次いでクロロホルムとアセトンの比が80:20、60:40、40:60、20:80の混合物で順次溶出させた。その結果、クロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が80:20の溶出画分に強いアポトーシス誘発活性を確認した。

アポトーシス誘発活性が確認された画分に関して実施例1に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図13、14、15、16にクロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が80:20の溶出画分の各々の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図13、14はクロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が80:20の溶出画分の各々の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図15、16はクロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が80:20の溶出画分の各々の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度(%)、横軸上部は保持時間(分)、下部はスキャン番号を示す。

図13、15に示すように、クロロホルム溶出画分からはヘキサデカン酸(パルミチン酸)（図13ピーク1）のメチルエステル、グリセロール由来のピーク（図15ピーク1）が検出された。また図14、16に示すようにクロロホルム

**THIS PAGE BLANK (USPS)**

とアセトンの比が 80 : 20 の溶出画分からはテトラデカン酸（ミリスチン酸）（図 14 ピーク 1）、及びヘキサデカン酸（パルミチン酸）（図 14 ピーク 2）のメチルエステル、グリセロール由来のピーク（図 16 ピーク 1）が検出された。

以上、上記分画にはグリセロ脂質が含有されていることが確認され、グリセロ脂質がアポトーシス誘発活性を有することが明らかとなった。

### 実施例 3

(1) 実施例 1 - (1) 記載のガゴメ昆布由来の抽出液の 40 倍濃縮物 230 ml に水を添加し 910 ml とし、これにエタノール 490 ml を添加し、2 時間かくはん後、遠心分離し、35% エタノール可溶物を調製した。この 35% エタノール可溶物を濃縮乾固後、水 100 ml を添加し、次いでクロロホルム : エタノール = 2 : 1 の混合液 400 ml を添加し、充分かくはん後、分離した上層液を回収した。下層の有機溶媒相を留去後、水を加えて 100 ml とし、この操作を 3 回繰り返して得られた上層液を濃縮乾固後、クロロホルム 10 ml を添加し、クロロホルム可溶物を得た。このクロロホルム可溶物を濃縮後、あらかじめクロロホルムで平衡化した 200 ml のイアトロビーズ 6RS-8060 (ヤトロン社製) カラムにかけ、クロロホルムで溶出し、次いでクロロホルムとアセトンの比が 90 : 10、70 : 30、40 : 60、20 : 80 の混合物で順次溶出させた。

その結果、クロロホルム溶出画分とクロロホルムとアセトンの比が 40 : 60 の溶出画分に強いアポトーシス誘発活性を確認した。

(2) クロロホルム溶出画分につき、シリカゲルプレート 60F<sub>254</sub> (メルク社製) 上にスポットした後、展開溶媒としてヘキサン : エーテル = 9 : 1 を用い、薄層クロマトグラフィーを行ったところ、R<sub>f</sub> 値約 0.25 にアポトーシス誘発活性を有する単一スポットが検出された。

このスポットに関して実施例 1 に記載の方法で各種成分の分析を行った。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図17、18にR<sub>f</sub>値約0.25のスポットの脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図17はR<sub>f</sub>値約0.25のスポットの脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図18はR<sub>f</sub>値約0.25のスポットの糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度(%)、横軸上部は保持時間(分)、下部はスキャン番号を示す。

図17、18に示すようにR<sub>f</sub>値約0.25のスポットからテトラデカン酸(ミリスチン酸)(図17ピーク1)、ヘキサデカン酸(パルミチン酸)(図17ピーク2)、及びオクタデセン酸(オレイン酸)(図17ピーク3)の各々のメチルエステル、及びグリセロール由来のピーク(図18ピーク1)が検出された。

(3) クロロホルムとアセトンの比が40:60の溶出画分につき、展開溶媒としてクロロホルム:メタノール=95:12を展開溶媒として用い、薄層クロマトグラフィーを行ったところ、R<sub>f</sub>値約0.33にアポトーシス誘発活性を有するスポットが検出された。

このスポットに関して実施例1に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図19、20にR<sub>f</sub>値約0.33のスポットの脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図19はR<sub>f</sub>値約0.33のスポットの脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図20はR<sub>f</sub>値約0.33のスポットの糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度(%)、横軸上部は保持時間(分)、下部はスキャン番号を示す。

図19、20に示すようにR<sub>f</sub>値約0.33のスポットからはテトラデカン酸(ミリスチン酸)(図19ピーク1)、及びヘキサデカン酸(パルミチン酸)(図19ピーク2)のメチルエステル、ガラクトース由来のピーク(図20ピーク

**THIS PAGE BLANK (88716)**

2、3、4) 及びグリセロール由来のピーク(図20ピーク1)が検出された。

以上、上記実施例3-(2)及び実施例3-(3)記載のスポットにはグリセロ脂質、グリセロ糖脂質が含有されていることが確認され、グリセロ脂質及びグリセロ糖脂質がアポトーシス誘発活性を有することが明らかとなった。

#### 実施例4

ガゴメ昆布乾燥物の1mm角破碎品2.5kgに10倍量の水を添加し、昆布が膨潤した後、上清を遠心除去した。昆布膨潤物に最終10倍量の60%エタノールとなるようにエタノール及び水を添加し、37℃、3時間かくはん後、遠心分離により上清液を調製した。上清液を濃縮後、その水溶液750mlにクロロホルム、メタノールをクロロホルム：メタノール：水=2：4：0.8となるように添加し充分かくはん後、下層の有機相液を分離した。

この下層液を濃縮乾固後、クロロホルム可溶物を調製した後、あらかじめクロロホルムで平衡化した200mlのイアトロビーズ 6RS-8060(ヤトヨン社製)カラムにかけ、クロロホルムで溶出し、次いでクロロホルムとアセトンの比が40：60の混合液、アセトン、メタノールで順次溶出させた。

各溶出画分を濃縮後、シリカゲルプレート60F<sub>254</sub>にスポットし、ブリムリン試薬及びオルシノール硫酸試薬を各々用いて糖脂質の検出を行い、両画分の糖脂質の存在を確認した。その結果、極性の低い溶媒で溶出した画分ほど脂質の含量が高く、又アポトーシス誘発作用も強い活性を示した。

#### 実施例5

乾燥ガゴメコンブをミキサーで粉碎した。このコンブ粉末0.5gに対して25mlの①60mM HCl、②1M 酢酸、③1% NaHCO<sub>3</sub>、④1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、⑤1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、⑥クロロホルム：メタノール=2：1、⑦75%エタノール水溶液、⑧0.1% SDS、又は⑨0.01% SDSを加え、①、②、③、④、及び⑦は60℃で、それ以外は37℃で3時間抽出した。

**THIS PAGE BLANK (USM)**

。なお、今後①～⑨の溶液を一次抽出液と呼ぶ。①と②はNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で、④と⑤はHClで中和し、それ以外はそのまま遠心分離した後、以下の操作を行った。

A. 沈殿に25mlの75%エタノール水溶液を加えて60℃で2時間抽出し、遠心上清を減圧下濃縮乾固した後1mlの75%エタノール水溶液に溶解する。

B. 10mlの上清に3.0mlのエタノールを加えて混合し、遠心上清を減圧下濃縮乾固した後0.4mlの75%エタノール水溶液に溶解する。

C. 上清を減圧下乾固し、1mlの75%エタノール水溶液に溶解する。

こうして得られた抽出液を75%エタノール水溶液で希釈し、96穴マイクロタイタープレートのウェルに5μlずつ加えて風乾した後、5000個のHL-60細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI1640培地100μlを加え、後述の実施例7に記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性を測定した。

その結果、表1に示す結果が得られた。すなわち、表1は抽出方法とがん細胞増殖抑制活性の関係を示す表であり、表1中の数字はがん細胞増殖抑制活性を有していた希釈液の希釈倍率を示す。75%エタノール水溶液で抽出する前に酸性(①A.)又はアルカリ性(③A.、④A.、⑤A.)の一次抽出液で粉末コーンブを処理することによって無処理区(⑦C.)に比べて2倍のがん細胞増殖抑制活性物質が抽出された。またこれらの画分について後述の実施例8記載の方法によりアポトーシス誘発活性を測定し、がん細胞増殖抑制活性画分のアポトーシス誘発作用を確認した。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

表 1

一次抽出液	A.	B.	C.
①	8	< 2	
②	4	4	
③	8	—	
④	8	4	
⑤	8	2	
⑥			8
⑦			4
⑧		2	
⑨		< 2	

## 実施例 6

(1) 市販のブナシメジ、ハタケシメジ、マイタケ、エノキタケ、シイタケナメコをそれぞれ凍結乾燥し、凍結乾燥物を調製し、その粉碎物を調製した。

上記きのこの粉碎物各 0.5 g に 75% エタノール水溶液を 25 ml 添加し、室温で 2 時間抽出した。遠心分離により、抽出液を得た後、該抽出液を減圧下濃縮乾固し、乾燥物を調製した。この乾燥物を水 1 ml に溶解し、エタノール抽出液を調製した。

(2) 上記実施例 6 - (1) 記載のエタノール抽出液のがん細胞増殖抑制活性を測定した。

エタノール抽出液をそれぞれ G D / X P E S フィルター (ワットマン社製) でろ過滅菌し、滅菌水で希釈系列を作製した。各希釈液 10 μl を 96 穴マイクロタイヤープレートのウェルに入れ、そこに 5000 個の HL-60 細胞を含む 10% 牛胎児血清含有 RPMI 1640 培地 100 μl を加え、5% 炭酸ガス存

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

在下、37°Cで48時間培養した。細胞の形態を光学顕微鏡で観察した後、5mg/m1の3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド(MTT;シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液10μlを加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04N HC1含有2-プロピルアルコール100μlを加えてよくかくはんし、590nmにおける吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした。

きのこのエタノール抽出液のがん細胞増殖抑制活性に関しては、ブナシメジの30倍希釈液と、ハタケシメジの10倍希釈液で細胞は死滅し、強いがん細胞増殖抑制活性が認められ、アポトーシス小体が見られた。またマイタケ、エノキタケ、シイタケ、ナメコの3倍希釈液で細胞は死滅しており、10倍希釈液においてアポトーシス小体が見られ、各きのこのエタノール抽出液は強いがん細胞増殖抑制活性とアポトーシス誘発作用を有していた。

(3) 実施例6-(1) 記載のブナシメジのエタノール抽出液に関して実施例1に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図21、22にブナシメジのエタノール抽出液中の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図21はブナシメジのエタノール抽出液中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図22はブナシメジのエタノール抽出液中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度(%)、横軸上部は保持時間(分)、下部はスキャン番号を示す。

図21、22に示すようにブナシメジのエタノール抽出液中にはヘキサデカノ酸(パルミチン酸)(図21ピーク1)、及びシス-9,シス-12-オクタデカジエン酸(リノール酸)(図21ピーク2)のメチルエステル、グルコース由来のピーク(図22ピーク2、3、4、)、マンニトール由来のピーク(図22ピーク5)及びグリセロール由来のピーク(図22ピーク1)が検出された。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

また他のきのこのエタノール抽出物に関してもグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質の存在を確認した。

### 実施例 7

実施例 6 記載のブナシメジの凍結乾燥粉碎物 5 g を 250 ml の 75% エタノール水溶液に懸濁し、室温で 2 時間振とうした後、遠心分離で上清と沈殿に分離し、抽出液を得た。この抽出液を、ロータリーエバポレーター (30°C) で濃縮乾固し、20 ml の 75% エタノール水溶液に再溶解して、ブナシメジ抽出濃縮物を得た。このブナシメジ抽出濃縮物の一部に 1/2 体積の水、ブナシメジ抽出濃縮物と等量のクロロホルムを添加し懸濁した後に、静置して上層と下層に分画した。分画した上層、下層それぞれを濃縮乾固した後、分画に用いたブナシメジ抽出濃縮物の 1/2 量の 75% エタノール水溶液に再溶解して、それぞれの画分のがん細胞増殖抑制活性を以下のように測定した。

それぞれの画分の 75% エタノール水溶液再溶解物の希釈系列を 75% エタノール水溶液で作製した。各希釈液 5 μl を 96 穴マイクロタイプレートに入れ、乾燥させた後、そこに 5000 個の HL-60 細胞 (ATCC CCL-240) を含む 10% 牛胎児血清含有 RPMI 1640 培地 100 μl を加え、5% 炭酸ガス存在下、37°C で 48 時間培養した。細胞の形態を光学顕微鏡で観察した後、5 mg/ml の MTT リン酸緩衝食塩水溶液 10 μl を加えて更に 4 時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、0.04 N HCl 含有 2-プロピルアルコール 100 μl を加えてよくかくはんし、590 nm における吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした (MTT 法)。

その結果、下層からの上記画分の 20 倍希釈液で細胞は死滅し、強いがん細胞増殖抑制活性が認められ、アポトーシス小体が確認された。そこで、このブナシメジ抽出濃縮物を同様の操作で、クロロホルム分画を行い、75% エタノール水溶液ではなく、シリカゲルカラムクロマト用の移動相に再溶解した後、シリカゲルカラムクロマトを行った。シリカゲルカラムクロマトは、移動相として、クロ

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ロホルム：メタノール：水 = 65 : 25 : 4 (条件1)、クロロホルム：メタノール = 65 : 25 (条件2) の2条件でそれぞれ独立して行った。それぞれのシリカゲルカラムクロマトのフラクションを濃縮乾固し、最初の液量の1/20量の75%エタノール水溶液に再溶解して、前述と同様のMTT法でがん細胞増殖抑制活性を測定し、活性が確認された画分をTLC (クロロホルム：メタノール : 水 = 65 : 25 : 4) で分析した。その結果、条件1では、プリムリン試薬に反応するスポット（脂質）、ニンヒドリン試薬に反応するスポット（アミノ基）、オルシノール硫酸に反応するスポット（糖）、ディットマー試薬に反応するスポット（リン脂質）が存在するA画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するB画分に活性が存在した。条件2では、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するC画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するD画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、ニンヒドリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するE画分に活性が存在した。更に、条件1のA画分を集めて濃縮乾固後、移動相に溶解してシリカゲルカラムクロマトを行った。移動相として、クロロホルム：メタノール = 95 : 5 (条件3) を用いた。前回と同様に各フラクションをMTT法でアッセイし、活性が確認された画分をTLC (クロロホルム：メタノール = 95 : 5) で分析した。その結果、条件3においては、プリムリン試薬に反応するスポットが存在するF画分と、プリムリン試薬に反応するスポット、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するG画分と、オルシノール硫酸に反応するスポットが存在するH画分に活性が存在した。これらのがん細胞増殖抑制活性区分のアポトーシス誘発活性をアポトーシス小体の形成により確認した。

#### 実施例8

実施例6記載のブナシメジの凍結乾燥粉碎物1gを50mlの75%エタノール水溶液、及び50%エタノール水溶液に懸濁し、37°Cで2時間振とうした後、遠心分離で上清と沈殿に分離し、各々の抽出液を得た。これらの抽出液をロー

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

タリーエバポレーター(30°C)で濃縮乾固し、各々、8mlの75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液に再溶解してブナシメジ抽出濃縮物を得た。

これらのブナシメジ抽出濃縮物を75%エタノール水溶液、又は50%エタノール水溶液で希釈した。これらの各希釈液を用い、実施例7記載のMTT法でアッセイした。75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液抽出物の10倍希釈液添加区分で細胞死が認められ、がん細胞増殖抑制活性が確認され、75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液両抽出条件において、がん細胞増殖抑制活性物質が抽出されていることが確認された。更に、これらのブナシメジ抽出濃縮物を用いてアポトーシス誘発活性を測定した。すなわち、上記抽出濃縮液25μlを試料とし、エタノールを揮発せしめた後に、牛胎児血清10%を含有するRPMI1640培地にて培養したHL-60細胞 $2 \cdot 5 \times 10^5$ 個/4.5mlに添加し、37°C、48時間培養した。同時に对照試料として、蒸留水及びアポトーシス誘発活性を有することが判っているアクチノマイシンD溶液(1.0μg/ml)を添加した。光学顕微鏡下でアポトーシス小体の形成、細胞の収縮、核の凝縮を肉眼観察し、生細胞数をカウントした。これらの現象が観察され、生細胞数の減少が認められるものをアポトーシス誘発活性有りと判断した。その結果、75%エタノール水溶液、50%エタノール水溶液抽出物にアポトーシス誘発物質が存在することが確認された。

### 実施例9

(1) 市販のヒラタケとマッシュルーム各々の凍結乾燥粉末0.5gに25mlの75%エタノール水溶液を加え、37°Cで2時間抽出した。遠心上清を減圧下濃縮乾固し、1mlの75%エタノール水溶液に溶解した後、75%エタノール水溶液で希釈した。希釈液1μlに5000個のHL-60細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI1640培地100μlを添加し、実施例7に記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、ヒラタケの2倍希釈液とマッシュルームの非希釈液に両活性が見られた。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(2) 40 g の実施例6記載のブナシメジに0(0%)、50(25%)、100(50%)、又は150ml(75%)のエタノールと160、110、60、又は10mlの水を加えてミキサーで30秒間ホモジナイズし、室温で2時間振とうした後、ろ過によって抽出液を得た。この抽出液を75%エタノール水溶液で希釈し、実施例7に記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、0、25、50%エタノール水溶液抽出物の2倍希釈液と75%エタノール水溶液抽出物の5倍希釈液に両活性が見られた。

前記ブナシメジを3~5mm角に裁断したもの40gに50(25%)、100(50%)、又は150ml(75%)のエタノールと110、60、又は10mlの水を加え、室温で2時間振とうした後、ろ過によって抽出液を得た。この抽出液を75%エタノール水溶液で希釈し、実施例7記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定した。その結果、25%エタノール抽出物の原液(非希釈)と50%及び75%エタノール水溶液抽出物の2倍希釈液に両活性が見られた。

(3) 市販のシイタケを凍結乾燥して粉碎した粉末を表2に示す条件で2時間抽出した。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

表 2

	シイタケ 粉末(g)	エタノール 濃度(%)	抽出液量(ml)	抽出温度 (°C)
①	0. 5	25	20	60
②	0. 5	75	10	室温
③	0. 5	50	10	室温
④	0. 5	75	25	室温

抽出後遠心によって不溶物を除き、上清を減圧下濃縮乾固した後抽出液と同じ濃度のエタノール水溶液1mlに溶解した。この液を75%エタノール水溶液で希釈し、実施例7記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定したところ、①の10倍希釈液、②の2倍希釈液、③の5倍希釈液、及び④の5倍希釈液に両活性が見られた。

(4) 市販のシイタケを傘と軸に分け、別々に凍結乾燥したのち粉碎し、その粉末0.5gに2.5mlの75%エタノール水溶液を加えて37°Cで2時間抽出した。遠心上清を減圧下濃縮乾固し、1mlの75%エタノール水溶液に溶解した後、75%エタノール水溶液で希釈した。この希釈液のがん細胞増殖抑制活性を実施例7記載のMTT法、アポトーシス誘発活性を実施例8記載の方法で測定したところ、傘抽出液の2倍希釈液と軸抽出液の20倍希釈液に両活性が見られた。中国産干しシイタケの上級品と、中級品の傘と軸についてもミキサーで粉碎して同様の抽出とアポトーシス誘発活性の測定を行ったところ、上級品抽出液、中級品傘抽出液、及び中級品軸抽出液の各々5倍希釈液に両活性が見られた。

## 実施例10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(1) 市販の抹茶 0.5 g に水又は 75% エタノール水溶液 25 ml を加え、室温で 2 時間振とうした。抽出物を遠心分離した後、上清を減圧下濃縮乾固し、1 ml の水に溶解した。

この抽出液を 1 倍から 100 倍まで希釈し、希釈液 10 μl と 5000 個の HL-60 細胞を含む 10% ワシ胎児血清含有 RPMI 1640 培地 100 μl を 96 穴マイクロタイタープレートのウェルに添加して 48 時間培養し、光学顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。その結果、水抽出物、75% エタノール抽出物共にすべての希釈段階添加区分で細胞は死滅しており、茶の水抽出物、エタノール抽出物は強いがん細胞増殖抑制活性を有していた。またアポトーシス小体の形成によりアポトーシス誘発作用を確認した。

(2) 実施例 10 - (1) 記載の抹茶のエタノール抽出液に関して実施例 1 に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図 23、24 に抹茶のエタノール抽出液中の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図 23 は抹茶のエタノール抽出液中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図 24 は、抹茶のエタノール抽出液中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度 (%)、横軸上部は保持時間 (分)、下部はスキャン番号を示す。

図 23、24 に示すように抹茶のエタノール抽出液中にはヘキサデカン酸 (パルミチン酸) (図 23 ピーク 1) 及び 9, 12, 15-オクタデカトリエン酸 (リノレン酸) (図 23 ピーク 2) のメチルエステル、グルコース由来のピーク (図 24 ピーク 3、4) 及びグリセロール由来のピーク (図 24 ピーク 1) が検出されグリセロ脂質及び/又はグリセロ糖脂質の存在を確認した。またミオイノシトール由来のピーク (図 24 ピーク 5)、キナ酸由来のピーク (図 24 ピーク 2) も検出された。

### 実施例 11

**THIS PAGE BLANK (use reverse)**

(1) 米糠 0.5 g に水、75%エタノール水溶液又は90%エタノール水溶液を加え、室温で2時間振とうした。抽出物を遠心分離した後、上清を減圧下濃縮乾固し、1 ml の水に溶解した。90%エタノール水溶液抽出物に関しては水不溶物をエタノールに溶解した。これらの試料を希釈して実施例7記載のMTT法によりがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性を測定したところ、水抽出物は5倍希釈液、75%エタノール抽出物は非希釈液、90%エタノール抽出物はエタノール可溶画分の10倍希釈液に両活性が見られ、米糠のエタノール抽出物は強いがん細胞増殖抑制活性及びアポトーシス誘発作用を有していた。

(2) 実施例1.1-(1)記載の75%エタノール抽出物に関して実施例1に記載の方法で各種成分の分析を行った。

図25、26に米糠の75%エタノール抽出物中の脂質成分又は糖成分の全イオンクロマトグラムを示す。すなわち図25は米糠の75%エタノール抽出物中の脂質成分の全イオンクロマトグラムを示す図であり、図26は、米糠の75%エタノール抽出物中の糖成分の全イオンクロマトグラムを示す図である。各図において縦軸は相対強度(%)、横軸上部は保持時間(分)、下部はスキャン番号を示す。

図25、26に示すように米糠の75%エタノール抽出物中にはヘキサデカン酸(パルミチン酸)(図25ピーク1)及びオクタデセン酸(オレイン酸)(図25ピーク3)、シス-9,シス-12-オクタデカジエン酸(リノール酸)(図25ピーク2)のメチルエステル、グルコース由来のピーク(図26ピーク2、3)及びグリセロール由来のピーク(図26ピーク1)が検出されグリセロ脂質及び/又はグリセロ糖脂質の存在を確認した。

### 実施例1.3

ほうれん草由来モノガラクトシルジグリセリド(和光純薬社製)、小麦由来モ

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ノガラクトシルジグリセリド（フナコシ社製）、小麦由来ジガラクトシルジグリセリドを微量のn-デカンに懸濁し、超音波処理により更に分散させ、ここにn-デカン：エタノール=2：98の割合となるようエタノールを加えた。この溶液をRPMI 1640培地で50倍に希釈し、更にその0.5mlを、牛胎児血清10%を含有するRPMI 1640にて培養したHL-60細胞2.5×10<sup>5</sup>個を含有する培養液4.5mlに加え、37°C、48時間培養し、それぞれのアポトーシス誘発作用を実施例1-(4)記載の方法により測定し、強いアポトーシス誘発作用とがん細胞増殖抑制活性を確認した。

#### 実施例14

市販のキャベツ、ナスの皮、ナスの皮を除いた部分、及びホウレンソウの葉を凍結乾燥した後粉碎し、実施例9-(4)と同様の方法で抽出を行い、実施例7記載のMTT法でがん細胞増殖抑制活性、実施例8記載の方法でアポトーシス誘発活性の測定を行ったところ、キャベツ抽出液、ナスの皮抽出液、及びホウレンソウの葉抽出液の2倍希釈液とナスの皮を除いた部分抽出液の5倍希釈液に両活性が見られた。

#### 発明の効果

本発明により、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質、例えば植物、微生物又は動物由來の強いアポトーシス誘発作用を有するグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とするアポトーシス誘発剤が提供される。このグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質は植物、微生物又は動物の膜成分中に多量に存在し、含水エタノール抽出等により効率よく抽出され、簡便に本発明の有効成分を得ることができる。溶媒抽出の前に、酸又はアルカリ処理を行うことにより、抽出効率を向上させることが可能である。またその疎水性の度合いにより、抽出溶媒の極性の選択、分離用クロマト担体の選択等ができ、目的のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を選択的に製造することができる。特に食用植物、微生物又は動物から抽出及び／又は精製した本発明のアポトーシス誘発化合物のグリセロ

**THIS PAGE BLANK (uspro)**

脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は、日常的に摂取することにより健康が増進し、健康食品として極めて有用なものである。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 請求の範囲

1. (補正後) 分子構造中にリン酸エステル及びホスホン酸エステルを含有しない、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有効成分とすることを特徴とするアポトーシス誘発剤。
2. (削除)
3. (補正後) グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲1記載の剤。
4. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が茶類、キノコ類、藻類又は穀類カス由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求項3記載の剤。
5. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求の範囲3記載の剤の製造方法。
6. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有物を、酸又はアルカリで処理する工程を包含することを特徴とする請求の範囲5記載の剤の製造方法。
7. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー又は順相クロマトグラフィーから選択された方法により分離する工程を包含することを特徴とする請求の範囲5に記載の剤の製造方法。
8. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が茶類、キノコ類、藻類又は穀類カス由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲5～7いずれか1項に記載の剤の製造方法。
9. (補正後) 分子構造中にリン酸エステル及びホスホン酸エステルを含有しない、グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を含有、添加及び／又は希釈してなるアポトーシス誘発用食品又は飲料。
10. (削除)
11. (補正後) グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲9に記載の食

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

品又は飲料。

12. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が茶類、キノコ類、藻類又は穀類  
カス由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲 1 1 記載の  
食品又は飲料。

13. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を有  
機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 1 1 記載の食品又  
は飲料の製造方法。

14. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質含有  
物を、酸又はアルカリで処理する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 1  
3 記載の食品又は飲料の製造方法。

15. 植物、微生物又は動物由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質を疎  
水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー又は順相クロマトグラフィーか  
ら選択された方法により分離する工程を包含することを特徴とする請求の範囲 1  
3 に記載の食品又は飲料の製造方法。

16. グリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質が茶類、キノコ類、藻類又は穀類  
カス由来のグリセロ脂質及び／又はグリセロ糖脂質である請求の範囲 1 3 ～ 1 5  
いずれか 1 項に記載の食品又は飲料の製造方法。

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**